

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

10.10.03

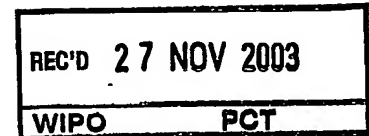
18 NOV 2003

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年10月11日

出願番号  
Application Number: 特願2002-299289  
[ST. 10/C]: [JP2002-299289]



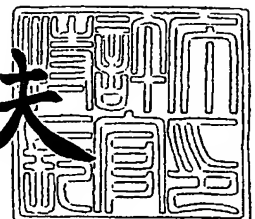
出願人  
Applicant(s): 中外製薬株式会社  
尾崎 修治  
安倍 正博

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月13日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 C1-A0220

【提出日】 平成14年10月11日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

    【住所又は居所】 徳島県徳島市中吉野町3丁目50-1

    【氏名】 尾崎 修治

【発明者】

    【住所又は居所】 徳島県徳島市南佐古3番町7-12

    【氏名】 安倍 正博

【発明者】

    【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

    【氏名】 土屋 政幸

【発明者】

    【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

    【氏名】 木村 直紀

【発明者】

    【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

    【氏名】 川合 重人

【特許出願人】

    【識別番号】 000003311

    【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【特許出願人】

    【住所又は居所】 徳島県徳島市中吉野町3丁目50-1

    【氏名又は名称】 尾崎 修治

## 【特許出願人】

【住所又は居所】 徳島県徳島市南佐古 3 番町 7 - 1 2

【氏名又は名称】 安倍 正博

## 【代理人】

【識別番号】 100102978

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞死誘導剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト白血球抗原（HLA）を認識する低分子化抗体。

【請求項 2】 HLAがHLA class Iである、請求項 1 に記載の低分子化抗体。

【請求項 3】 HLA class IがHLA-Aである、請求項 2 に記載の低分子化抗体

。

【請求項 4】 2D7抗体の低分子化抗体。

【請求項 5】 低分子化抗体がDiabodyである請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の低分子化抗体。

【請求項 6】 以下の（a）～（d）のいずれかに記載の低分子化抗体。

（a） 配列番号：6 に記載のアミノ酸配列を有する低分子化抗体。

（b） 配列番号：6 に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する低分子化抗体であって、（a）に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。

（c） 配列番号：2 のCDRおよび配列番号：4 のCDRのアミノ酸配列を有する低分子化抗体。

（d） 配列番号：2 のCDRおよび配列番号：4 のCDRのアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する低分子化抗体であって、（c）に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。

【請求項 7】 HLAを認識する抗体を低分子化することによって、活性が上昇した抗体を製造する方法。

【請求項 8】 HLAがHLA class Iである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 HLA class IがHLA-Aである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】 2D7抗体を低分子化することによって、活性が上昇した抗体を製造する方法。

【請求項 11】 低分子化がDiabody化である、請求項 7 ～ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2】 活性が細胞死誘導活性又は細胞増殖抑制活性である、請求項 7～11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3】 請求項 1～6 のいずれかに記載の低分子化抗体、請求項 7～12 のいずれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体、または 2D7 抗体を有効成分として含有する、細胞死誘導剤。

【請求項 1 4】 B細胞またはT細胞に対する細胞死誘導であることを特徴とする、請求項 1 3 に記載の細胞死誘導剤。

【請求項 1 5】 B細胞またはT細胞が、活性化B細胞または活性化T細胞である、請求項 1 4 に記載の細胞死誘導剤。

【請求項 1 6】 請求項 1～6 のいずれかに記載の低分子化抗体、請求項 7～12 のいずれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体、または 2D7 抗体を有効成分として含有する、細胞増殖抑制剤。

【請求項 1 7】 請求項 1～6 のいずれかに記載の低分子化抗体、請求項 7～12 のいずれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体、または 2D7 抗体を有効成分として含有する、抗腫瘍剤。

【請求項 1 8】 腫瘍が血液腫瘍である請求項 1 7 に記載の抗腫瘍剤。

【請求項 1 9】 請求項 1～6 のいずれかに記載の低分子化抗体、請求項 7～12 のいずれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体、または 2D7 抗体を有効成分として含有する、自己免疫疾患治療剤。

【請求項 2 0】 抗体が Diabody である請求項 1 3～15 のいずれかに記載の細胞死誘導剤。

【請求項 2 1】 抗体が Diabody である請求項 1 6 に記載の細胞増殖抑制剤。

【請求項 2 2】 抗体が Diabody である請求項 1 7 または 1 8 に記載の抗腫瘍剤。

【請求項 2 3】 抗体が Diabody である請求項 1 9 に記載の自己免疫疾患治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、HLAを認識する抗体の低分子化抗体に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

HLA class Iや $\beta$ 2Mに対する抗体が種々の血球系細胞に対して、増殖抑制、アポトーシスを誘導することが知られている。たとえば抗HLA class I $\alpha$ 3 domain抗体(5H7)は抗体をクロスリンクすることにより、Jurkat細胞や、ヒト抹消単核球由来T細胞、NK細胞、B細胞に対してアポトーシスを誘導することが報告されている(非特許文献1)。また、GenestierらのグループはHLA class I $\alpha$ 1 domainに対する抗体(MoAb90、YTH862)が、クロスリンクを必要とせずに活性化したT細胞特異的にアポトーシスを誘導することを示している(非特許文献2)。興味深いことにこれらの抗体は、休止期のT細胞に対してはほとんど作用しない。なぜこれらのHLA class Iに対する抗体が活性化したT細胞に特異的に作用するのかは分かっていない。おそらくT細胞が活性化することで抗HLA抗体によるアポトーシス感受性が高い状態になるものと思われるが、その詳細なメカニズムについては不明である。一方Matsuokaらのグループが作製した、MHA class I $\alpha$ 2 domainを認識するマウス抗体(RE2)も正常なリンパ球には影響を示さず、活性化したT、B細胞やLymphomaに対してのみ、抗体クロスリンクすることで細胞殺傷活性を発揮することが報告されている(非特許文献3)。他の抗体と違いこのRE2が誘導するのはネクローシスやアポトーシスの特徴を伴わないまったく新しいタイプの細胞死であることが確かめられている。その細胞死誘導の機構については今のところ不明である。

## 【0003】

2D7抗体は、徳島大学第一内科のグループにより患者由来leukemiaを免疫することにより得られたマウス抗体である。すでに彼らにより、2D7抗体が種々のリンパ系腫瘍細胞の細胞表面に高い特性を持って結合することが示されている。しかしながら、2D7抗体の抗原は同定されてはいなかった。

## 【0004】

尚、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

【非特許文献1】 Woodle et al., J.Immunol., 158. 2156-2164 (1997)

【非特許文献2】 Genestier et al., Blood, 90. 3629-3639 (1997)

【非特許文献3】 Matsuoka et al., J.Exp.Med., 181(6), 2007-2015 (1995)

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、HLAを認識する抗体の低分子化抗体を提供することにある。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、2D7抗体の抗原を同定することを目的として、まず、2D7抗原発現細胞RPMI8226より精製したmRNAからランダムヘキサマーによりcDNAを合成した。これをレトロウイルスベクターpMXに挿入し、レトロウイルス発現ライブラリーを作製した。該レトロウイルス発現ライブラリーをBOSC23細胞にトランスフェクトすることでレトロウイルスにパッケージングした。その後得られたウイルスをNIH3T3細胞に感染させ、2D7抗体で染色した後、FACSにより発現解析を行うことで、2D7抗原のスクリーニングを行った。さらに、2D7抗原を発現しているRPMI 8226細胞、および、U266細胞によりcell lysateを調整し、免疫沈降法により2D7抗原の同定を行った。これらの検討の結果、2D7抗原はHLA class I分子であることが判明した。

#### 【0007】

本発明者らは、この知見に基づき、2D7抗体が細胞死誘導活性を有するか否かを検討した。具体的には、Jurkat細胞に2D7存在下、非存在下で、さらに抗マウスIgG抗体を加え培養を行い、48時間後、細胞核をHoechs33258で染色し、死細胞に特徴的な細胞核の断片化が認められるか観察した。その結果、Jurkat細胞において、2D7抗体をさらに抗マウスIgG抗体でクロスリンクすることで核の断片化が観察され、細胞死が誘導されることが分かった。

#### 【0008】

また、本発明者らは、細胞死誘導に対する2D7抗体の低分子化の効果を検討した。具体的には、細胞死誘導に対する、2D7抗体のDiabody化の効果を検討した。その結果、驚くべきことに、2D7抗体のDiabodyは、抗マウスIgG抗体を添加しな

くても非常に強力な細胞死誘導活性を示した。また、該Diabodyは、各種のミエローマ細胞やT細胞白血病細胞株に対して顕著な細胞死誘導を引き起こした。以上の結果は、HLAを認識する抗体の低分子化抗体が細胞死誘導剤として利用できることを示している。

【0009】

即ち、本発明は、以下の〔1〕～〔23〕を提供するものである。

〔1〕 ヒト白血球抗原（HLA）を認識する低分子化抗体。

〔2〕 HLAがHLA class Iである、〔1〕に記載の低分子化抗体。

〔3〕 HLA class IがHLA-Aである、〔2〕に記載の低分子化抗体。

〔4〕 2D7抗体の低分子化抗体。

〔5〕 低分子化抗体がDiabodyである〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の低分子化抗体。

〔6〕 以下の（a）～（d）のいずれかに記載の低分子化抗体。

（a） 配列番号：6に記載のアミノ酸配列を有する低分子化抗体。

（b） 配列番号：6に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する低分子化抗体であって、（a）に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。

（c） 配列番号：2のCDRおよび配列番号：4のCDRのアミノ酸配列を有する低分子化抗体。

（d） 配列番号：2のCDRおよび配列番号：4のCDRのアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する低分子化抗体であって、（c）に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。

〔7〕 HLAを認識する抗体を低分子化することによって、活性が上昇した抗体を製造する方法。

〔8〕 HLAがHLA class Iである、〔7〕に記載の方法。

〔9〕 HLA class IがHLA-Aである、〔8〕に記載の方法。

〔10〕 2D7抗体を低分子化することによって、活性が上昇した抗体を製造する方法。



〔11〕 低分子化がDiabody化である、〔7〕～〔10〕のいずれかに記載の方法。

〔12〕 活性が細胞死誘導活性又は細胞増殖抑制活性である、〔7〕～〔11〕のいずれかに記載の方法。

〔13〕 〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の低分子化抗体、〔7〕～〔12〕のいずれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体、または2D7抗体を有効成分として含有する、細胞死誘導剤。

〔14〕 B細胞またはT細胞に対する細胞死誘導であることを特徴とする、〔13〕に記載の細胞死誘導剤。

〔15〕 B細胞またはT細胞が、活性化B細胞または活性化T細胞である、〔14〕に記載の細胞死誘導剤。

〔16〕 〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の低分子化抗体、〔7〕～〔12〕のいずれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体、または2D7抗体を有効成分として含有する、細胞増殖抑制剤。

〔17〕 〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の低分子化抗体、〔7〕～〔12〕のいずれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体、または2D7抗体を有効成分として含有する、抗腫瘍剤。

〔18〕 腫瘍が血液腫瘍である〔17〕に記載の抗腫瘍剤。

〔19〕 〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の低分子化抗体、〔7〕～〔12〕のいずれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体、または2D7抗体を有効成分として含有する、自己免疫疾患治療剤。

〔20〕 抗体がDiabodyである〔13〕～〔15〕のいずれかに記載の細胞死誘導剤。

〔21〕 抗体がDiabodyである〔16〕に記載の細胞増殖抑制剤。

〔22〕 抗体がDiabodyである〔17〕または〔18〕に記載の抗腫瘍剤。

〔23〕 抗体がDiabodyである〔19〕に記載の自己免疫疾患治療剤。

#### 【0010】

#### 【発明の実施の形態】

本発明は、HLAを認識する低分子化抗体を提供する。本発明における低分子化

抗体は、活性が上昇している点で有用である。ここで、活性とは、抗体が抗原に結合することにより生じる生物学的作用をいう。具体的な例としては、細胞死誘導作用、アポトーシス誘導作用、細胞増殖抑制作用、細胞分化抑制作用、細胞分裂抑制作用、細胞増殖誘導作用、細胞分化誘導作用、細胞分裂誘導作用、細胞周期調節作用などを挙げることができるが、好ましくは細胞死誘導作用、細胞増殖抑制作用である。

#### 【0011】

細胞死誘導作用、細胞増殖抑制作用などの上記作用の対象となる細胞は特に限定されないが、血球系細胞や浮遊細胞が好ましい。血球系細胞の具体的な例としては、リンパ球（B細胞、T細胞）、好中球、好酸球、好塩基球、単球、ミエローマ細胞などを挙げることができるが、リンパ球（B細胞、T細胞）、ミエローマ細胞が好ましく、T細胞またはB細胞（特に活性化したB細胞または活性化したT細胞）が最も好ましい。浮遊細胞は、細胞を培養した際、細胞がガラスやプラスチックなどの培養器の表面に付着することなく、浮遊状態で増殖する細胞である。これに対し、接着細胞（付着細胞）とは、細胞を培養した際、ガラスやプラスチックなどの培養器の表面に付着する細胞である。

#### 【0012】

本発明においては、上記HLAを認識する低分子化抗体を投与することにより、例えば、血液腫瘍などの腫瘍（具体的な例として、白血病、骨髄異形成症候群、悪性リンパ腫、慢性骨髄性白血病、形質細胞異常症（多発性骨髄腫、マクログロブリン血症）、骨髄増殖性疾患（真性赤血球増加症、本態性血小板血症、特発性骨髄繊維症）など）や自己免疫疾患（具体的な例として、リウマチ、自己免疫性肝炎、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性水疱症、自己免疫性副腎皮質炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性精巣炎、自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性レセプター病、自己免疫不妊、クローン病、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、バセドウ病、若年性糖尿病、アジソン病、重症筋無力症、水晶体性ブドウ膜炎、乾癬、ベーチェット病、など）のような疾患の治療、予防などをおこなうことが可能である。

## 【0013】

本発明において、HLAとは、ヒト白血球抗原を意味する。HLA分子はclassIとclassIIに分類され、classIとしてはHLA-A、B、C、E、F、G、H、Jなどが知られており、classIIとしてはHLA-DR、DQ、DPなどが知られている。本発明の抗体が認識する抗原はHLA分子であれば特に制限されないが、好ましくはclassIに分類される分子であり、より好ましくはHLA-Aである。

## 【0014】

本発明において低分子化抗体とは、全長抗体(whole antibody、例えばwhole IgG等)の一部分が欠損している抗体断片を含み、抗原への結合能を有していれば特に限定されない。本発明の抗体断片は、全長抗体の一部分であれば特に限定されないが、重鎖可変領域(VH)又は軽鎖可変領域(VL)を含んでいることが好ましく、特に好ましいのはVHとVLの両方を含む断片である。抗体断片の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv(シングルチェーンFv)、などを挙げるができるが、好ましくはscFv(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883、Plickthun「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」Vol.113, Resenbourg 及び Moore編, Springer Verlag, New York, pp.269-315, (1994))である。このような抗体断片を得るには、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンなどで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい(例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

## 【0015】

本発明における低分子化抗体は、全長抗体よりも分子量が小さくなることが好ましいが、例えば、ダイマー、トリマー、テトラマーなどの多量体を形成すること等もあり、全長抗体よりも分子量が大きくなることもある。

## 【0016】

本発明において好ましい低分子化抗体は、抗体のVHを2つ以上及びVLを2つ以上含み、これら各可変領域を直接あるいはリンカー等を介して間接的に結合した抗体である。結合は、共有結合でも非共有結合でもよく、また、共有結合と非共有結合の両方でよい。さらに好ましい低分子化抗体は、VHとVLが非共有結合により結合して形成されるVH-VL対を2つ以上含んでいる抗体である。この場合、低分子化抗体中の一方のVH-VL対と他方のVH-VL対との間の距離が、全長抗体における距離よりも短くなる抗体が好ましい。

## 【0017】

本発明において特に好ましい低分子化抗体はDiabodyである。Diabodyは、可変領域と可変領域をリンカー等で結合したフラグメント（例えば、scFv等）（以下、Diabodyを構成するフラグメント）を2つ結合させて二量体化させたものであり、通常、2つのVLと2つのVHを含む(P.Holliger et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90, 6444-6448 (1993)、EP404097号、W093/11161号、Johnson et al., Method in Enzymology, 203, 88-98, (1991)、Holliger et al., Protein Engineering, 9, 299-305, (1996)、Perisic et al., Structure, 2, 1217-1226, (1994)、John et al., Protein Engineering, 12(7), 597-604, (1999)、Holliger et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 90, 6444-6448, (1993)、Atwell et al., Mol.Immunol. 33, 1301-1312, (1996))。Diabodyを構成するフラグメント間の結合は非共有結合でも、共有結合でよいが、好ましくは非共有結合である。

## 【0018】

また、Diabodyを構成するフラグメント同士をリンカーなどで結合して、一本鎖Diabody (scDiabody) とすることも可能である。その際、Diabodyを構成するフラグメント同士を20アミノ酸程度の長いリンカーを用いて結合すると、同一鎖上に存在するDiabodyを構成するフラグメント同士で非共有結合が可能となり、二量体を形成する。

## 【0019】

Diabodyを構成するフラグメントは、VLとVHを結合したもの、VLとVLを結合したもの、VHとVHを結合したもの等を挙げることができるが、好ましくはVHとVLを

結合したものである。Diabodyを構成するフラグメント中において、可変領域と可変領域を結合するリンカーは特に制限されないが、同一フラグメント中の可変領域の間で非共有結合がおこらない程度に短いリンカーを用いることが好ましい。そのようなリンカーの長さは当業者が適宜決定することができるが、通常2～14アミノ酸、好ましくは3～9アミノ酸、特に好ましくは4～6アミノ酸である。この場合、同一フラグメント上にコードされるVLとVHとは、その間のリンカーが短いため、同一鎖上のVLとVHの間で非共有結合がおこらず、単鎖V領域フラグメントが形成されない為、他のフラグメントとの非共有結合による二量体を形成する。さらに、Diabody作製と同じ原理で、Diabodyを構成するフラグメントを3つ以上結合させて、トリマー、テトラマーなどの多量体化させた抗体を作製することも可能である。

#### 【0020】

本発明におけるDiabodyとしては、配列番号：6に記載のアミノ酸配列を有するDiabodyまたは配列番号：6に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が変異（置換、欠失、挿入、および／または付加）したアミノ酸配列を有するDiabodyであって、配列番号：6に記載の配列を有するDiabodyと機能的に同等なDiabodyや、配列番号：2のCDR（又は可変領域）および配列番号：4のCDR（又は可変領域）のアミノ酸配列を有するDiabodyまたは配列番号：2のCDR（又は可変領域）および配列番号：4のCDR（又は可変領域）のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が変異（置換、欠失、挿入、および／または付加）したアミノ酸配列を有するDiabodyであって、配列番号：2のCDR（又は可変領域）および配列番号：4のCDR（又は可変領域）の配列を有するDiabodyと機能的に同等なDiabodyを例示できるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0021】

ここで「機能的に同等」とは、対象となるDiabodyが、配列番号：6に記載の配列を有するDiabody、または配列番号：2のCDR（又は可変領域）および配列番号：4のCDR（又は可変領域）の配列を有するDiabodyと同等の活性（例えば、HLA-Aへの結合活性、細胞死誘導活性、など）を有することを意味する。

#### 【0022】

変異するアミノ酸数は特に制限されないが、通常、30アミノ酸以内であり、好ましくは15アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内（例えば、3アミノ酸以内）であると考えられる。

#### 【0023】

また、配列番号：6に記載のアミノ酸配列を有するDiabodyまたは、配列番号：2のCDR（又は可変領域）および配列番号：4のCDR（又は可変領域）の配列を有するDiabodyを、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的としてヒト型化、キメラ化してもよい。

#### 【0024】

配列番号：2に記載されているアミノ酸配列で、1番目～134番目が可変領域に相当し、50～54が<sup>g</sup>CDR1、69～85が<sup>g</sup>CDR2、118～134が<sup>g</sup>CDR3に相当する。配列番号：4に記載されているアミノ酸配列で、1番目～128番目が可変領域に相当し、46～55が<sup>g</sup>CDR1、71～77が<sup>g</sup>CDR2、110～128が<sup>g</sup>CDR3に相当する。

#### 【0025】

本発明においてHLAを認識する低分子化抗体は、HLAに特異的に結合し、生物学的作用を有していれば特に制限されない。本発明の低分子化抗体は、当業者に公知の方法により作製することが可能である。例えば、実施例に記載されているように、HLAを認識する抗体の配列（特に可変領域の配列や相補鎖決定領域（CDR）の配列）を基に、当業者に公知の遺伝子組換え技術を用いて作製することが可能である。

#### 【0026】

HLAを認識する抗体の配列は、既に公知の抗体の配列を用いることが可能であり、又、HLAを抗原として、当業者に公知の方法により抗HLA抗体を作製し、その抗体の配列を取得して用いることも可能である。具体的には、例えば、以下のように行うことができる。HLAタンパク質若しくはその断片を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングする。抗原の調製は公知の方法、例えばバキュロウイルスを用いた方法（W098/46777など

）等に従って行うことができる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法（Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46）等に従って行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。その後、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V領域）のcDNAを合成し、得られたcDNAの配列を公知の方法により解読すればよい。

#### 【0027】

HLAを認識する抗体は、HLAと結合する限り特に制限はなく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、ヒト抗体等を適宜用いることができる。又、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト型化（Humanized）抗体なども使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体等であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

#### 【0028】

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region; FR）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト

抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

#### 【 0 0 2 9 】

これらキメラ抗体やヒト型化抗体などについては、低分子化した後にキメラ化やヒト型化等を行ってもよいし、キメラ化やヒト型化等を行った後に低分子化を行ってもよい。

#### 【 0 0 3 0 】

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる (特公平1-59878参照)。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる (国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照)。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (scFv) としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考にすることができる。

#### 【 0 0 3 1 】

本発明において、HLAを認識する抗体の好ましい例として2D7抗体が挙げられる。2D7抗体は、配列番号：2のCDR (又は可変領域) および配列番号：4のCDR (又は可変領域) の配列を有する抗体が例示できるが、これに限定されるものではなく、配列番号：2のCDR (又は可変領域) および配列番号：4のCDR (又は可変



領域)の配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が変異(置換、欠失、挿入、および/または付加)したアミノ酸配列を有する抗体であって、配列番号:2のCDR(又は可変領域)および配列番号:4のCDR(又は可変領域)の配列を有する抗体と機能的に同等な抗体もまた本発明の2D7抗体に含まれる。ここで「機能的に同等」とは、対象となる抗体が、配列番号:2のCDR(又は可変領域)及び配列番号:4のCDR(又は可変領域)の配列を有する抗体と同等の活性(例えば、HLA-Aへの結合活性、細胞死誘導活性、など)を有することを意味する。

### 【0032】

変異するアミノ酸数は特に制限されないが、通常、30アミノ酸以内であり、好ましくは15アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内(例えば、3アミノ酸以内)であると考えられる。変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸(G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸(S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸(C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸(D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸(R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸(H、F、Y、W)を挙げることができる(括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す)。あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び/又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている(Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

### 【0033】

また、2D7抗体を当業者に公知の方法でキメラ化、ヒト型化などを行うことも可能であり、このようなキメラ抗体、ヒト型化等された抗体も本発明の2D7抗体に含まれる。

## 【0034】

本発明の抗体は、ポリエチレングリコール (PEG)、放射性物質、トキシン等の各種分子と結合したコンジュゲート抗体でもよい。このようなコンジュゲート抗体は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。本発明における「抗体」にはこれらのコンジュゲート抗体も包含される。

## 【0035】

本発明は、本発明の抗体をコードするDNAを包含する。又、該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、抗原への結合能及び活性を有する抗体をコードするDNAを包含する。ハイブリダイゼーション技術(Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989)は当業者に公知であり、ハイブリダイゼーションの条件は、当業者であれば適宜選択することができる。ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば42℃、0.1×SSC、0.1%SDSの条件であり、好ましくは50℃、0.1×SSC、0.1%SDSの条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば65℃、5×SSC及び0.1%SDSの条件である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAが効率的に得られることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

## 【0036】

本発明のDNAは、本発明の抗体のin vivoやin vitroにおける生産に利用される他、例えば、遺伝子治療などへの応用も考えられる。本発明のDNAは、本発明の抗体をコードするものであればいかなる形態でもよい。即ち、mRNAから合成されたcDNAであるか、ゲノムDNAであるか、化学合成DNAであるかなどを問わない。また、本発明の抗体をコードする限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配

列を有するDNAが含まれる。

#### 【0037】

本発明の抗体は当業者に公知の方法により製造することができる。具体的には、目的とする抗体のDNAを発現ベクターへ組み込む。その際、発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。その際には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。

#### 【0038】

ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。

#### 【0039】

本発明の抗体を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 $\alpha$ 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター (Wardら, Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーター (Betterら, Science (1988) 240, 1041-1043)、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1 (ファルマシア社製)、「QIAexpress system」(キアゲン社製)、pEGFP、またはpET(この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい)などが挙げられる。

#### 【0040】

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。ポリペプチド分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (19

87) 169, 4379) を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

#### 【0041】

大腸菌以外にも、例えば、本発明のポリペプチドを製造するためのベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3（インビトロゲン社製）や、pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322)、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば「Bac-to-BAC baculovairus expression system」（ギブコBRL社製）、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えばpMH1、pMH2）、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えば、pZIPneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia Expression Kit」（インビトロゲン社製）、pNV11、SP-Q01）、枯草菌由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）が挙げられる。

#### 【0042】

CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター（Mulliganら, Nature (1979) 277, 108）、MLLV-LTRプロモーター、EF1 $\alpha$ プロモーター（Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322）、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418など）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

#### 【0043】

さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター（例えば、pCHOIなど）を導入し、メトトレキセート（MTX）により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター（pcDなど）で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピロー

マウウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

#### 【0044】

一方、動物の生体内で本発明のDNAを発現させる方法としては、本発明のDNAを適当なベクターに組み込み、例えば、レトロウイルス法、リポソーム法、カチオンリポソーム法、アデノウイルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター (例えばpAdexlcw) やレトロウイルスベクター (例えばpZIPneo) などが挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明のDNAの挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である (Molecular Cloning, 5.61-5.63)。生体内への投与は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。

#### 【0045】

また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。本発明の宿主細胞は、例えば、本発明の抗体の製造や発現のための産生系として使用することができる。ポリペプチド製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

#### 【0046】

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特に、DHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdh

fr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP (ペーリンガー・マンハイム社製) を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

#### 【0047】

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞がポリペプチド生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

#### 【0048】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、例えば、JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

#### 【0049】

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは、約6~8であるのが好ましい。培養は、通常、約30~40℃で約15~200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

#### 【0050】

一方、*in vivo* でポリペプチドを産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的

とするDNAを導入し、動物又は植物の体内でポリペプチドを産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

#### 【0051】

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

#### 【0052】

例えば、目的とするDNAを、ヤギ $\beta$ カゼインのような乳汁中に固有に産生されるポリペプチドをコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、目的の抗体を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生されるポリペプチドを含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

#### 【0053】

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的のDNAを挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的のポリペプチドを得ることができる (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

#### 【0054】

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的のDNAを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得ることができる (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

## 【0055】

これにより得られた本発明の抗体は、宿主細胞内または細胞外（培地など）から単離し、実質的に純粋で均一な抗体として精製することができる。抗体の分離、精製は、通常の抗体の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば抗体を分離、精製することができる。

## 【0056】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる（Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996）。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製された抗体も包含する。

## 【0057】

本発明において、抗体の抗原結合活性（Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）の測定には公知の手段を使用することができる。例えば、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）、EIA（酵素免疫測定法）、RIA（放射免疫測定法）あるいは蛍光免疫法などを用いることができる。

## 【0058】

本発明において、本発明の抗体が浮遊細胞に対して細胞死を誘導するか否かは、実施例と同様にJurkat細胞又はARH77細胞に対して細胞死を誘導するか否かにより判定することができる。又、抗体が接着細胞に対して細胞死を誘導するか否かは、実施例と同様にHeLa細胞に対して細胞死を誘導するか否かにより判定することができる。



## 【0059】

また、本発明は、本発明の低分子化抗体または2D7抗体を有効成分として含有する、細胞死誘導剤または細胞増殖抑制剤を提供する。本発明の低分子化抗体または2D7抗体の細胞死誘導活性は、活性化されたT細胞またはB細胞で特に効果が大きいと考えられるので、癌などの腫瘍（特に血液腫瘍）や自己免疫疾患の治療や予防に特に有効であると考えられる。低分子化されていない2D7抗体を有効成分として用いる場合には、抗IgG抗体などでクロスリンクすることが好ましい。

## 【0060】

上記抗体には各種試薬を結合してコンジュゲート抗体として使用することもできる。このような試薬としては、化学療法剤、放射性物質、トキシンなどを挙げることができる。このようなコンジュゲート抗体は公知の方法により作製することができる（US5057313、US5156840）。

## 【0061】

上記薬剤は、直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

## 【0062】

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる

。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

#### 【0063】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM)、HCO-50と併用してもよい。

#### 【0064】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

#### 【0065】

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

#### 【0066】

本発明の薬剤の投与量は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から1000mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgであると考えられる。

## 【0067】

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、通常、1日当り約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合であると考えられる。他の動物の場合も、体重60kg当りに換算した量、あるいは体表面積あたりに換算した量を投与することができる。

## 【0068】

## 【実施例】

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

## 〔1〕 細胞株

ヒトミエローマ細胞株（RPMI8226, K562, ARH77）、ヒトT細胞白血病細胞株（Jurkat）、FDC-P1、HCI-16、及び、2D7ハイブリドーマ細胞株（徳島大学由来）は10% FCSを含むRPMI1640 medium（GIBCO）で、ヒトミエローマ細胞株（IL-KM3、U266）は、同培地にそれぞれ2ng/ml IL-6（R & D）を添加し、Ba/F3は、同培地に2ng/ml IL-3（R & D）を添加し培養した。またCOS7, 293T, HeLa, NIH3T3及びBOSC23は10%FCSを含むDMEM medium（GIBCO）で、CHOは、 $\alpha$ -MEM medium（GIBCO）+ 5% FCSまたは10% FCSで培養した。

## 【0069】

## 〔2〕 pMX2 ベクターの作製

GFP遺伝子をウイルス粒子中にパッケージングするレトロウイルスベクターpMX-GFPのGFP遺伝子領域をEcoRI-SalIで切り出し除いた。この領域に、BstXI siteを配列上に持つアダプター（図1）（ABI DNA synthesizerで合成後、in vitroでアニールさせ使用）を挿入し、pMX2とした。

## 【0070】

## 〔3〕 cDNA libraryの作製

RPMI8226細胞より、Trisol（GIBCO）を用いて定法によりTotal RNAを精製した。さらに、このTotal RNA 200 $\mu$ gから、 $\mu$ MACS mRNA Isolation kit（Miltenyi

Biotec)を用い添付されたマニュアル書に従ってmRNAを精製した。3.6 $\mu$ gのmRNAを鋳型にしてrandom hexmer (SuperScript Choice System for cDNA Synthesis; Invitrogen)を用いてcDNAを合成した後、BstXI Adaptor (Invitrogen)を両末端に連結した。このcDNAを、BstXI CUTしたpMX2ベクターに挿入し、ELECTRO MAX DH10B (GIBCO)にエレクトロポレーション法により導入した(2.5KV, 200 $\Omega$ , 25 $\mu$ F)。その後、1mlのSOCを加え37度で一時間インキュベートし、40%グリセロール/LB+Amp 1mlを加え、一部をタイターチェックに使用し、残りは-80度に保存した。得られたライブラリーを、1ウェルあたり1000クローンになるように96穴プレート2枚に200 $\mu$ l/ウェル(7% DMSO/LB+Amp)で巻き込み、37度で一晩培養した。このプレートの4well分(4000クローン分)をアンピシリン入りLB培地(4ml)一本に植菌した。これを一つのプールとし、残りのwellについても同様の操作を行い、最終的にプレート一枚より24プールを作製した。各プールを37℃で一晩培養後DNAを調整し(QUIAGEN)、パッケージング細胞へのトランスフェクションに用いた。植菌に使用したプレートは二次スクリーニングで使用するまで-80度に保存した。

#### 【0071】

##### 〔4〕 抗体の精製

2D7抗体は、徳島大から送付された腹水0.5mlをProtein A Hi Trap Affinity column (Amersham Pharmacia)に吸着させたのち、IgG画分を0.1M Sodium Citrate, pH3.0で溶出し、回収した。これをセントリコン(YM-10; ミリポア)で濃縮したのちPBSにバッファー置換を行い、最終的にトータル5.34mgの抗体を得た。これらを分注して-20度に保存した(濃度0.89 $\mu$ g/ $\mu$ l)。

#### 【0072】

##### 〔5〕 FACS

付着細胞の場合は1mM EDTA/PBSで細胞をはがし、浮遊細胞の場合は遠心回収後FACS Buffer (2.5% FCS, 0.02% Na<sub>3</sub>/PBS)に懸濁し、2D7抗体(最終濃度10 $\mu$ g/ml)を含むbuffer (5% FCS/ PBS)中に氷上で一時間おいた。FACS Bufferで洗浄後、FITC-抗マウスIgG (Immunotech)溶液中(1:150, 50 $\mu$ l FACS Buffer)で、氷上で30分間反応させ、これをFACS Bufferで2回洗浄後、ELITE (QUALTER)で解

析を行った。

### 【0073】

#### 〔6〕 レトロウイルス感染

##### (i) レトロウイルスパッケージング

レトロウイルスパッケージング細胞であるBOSC23細胞は、トランスフェクション前日に $6 \times 10^5$ /well. 2mlで6 well plateに撒いておいた。トランスフェクションは以下の手順で行った。各プール由来プラスミドDNA  $1 \mu\text{g}$ に対してFuGENE 6 Transfection Reagent (Roche)  $3 \mu\text{l}$ を混ぜ室温で20分置いた後、前日撒いておいたBOSC23細胞の培地中に加えた。その後37度で48時間培養後培地を回収した。3000回転で5分遠心し死細胞を除いた培養液をウイルス液として使用した。

### 【0074】

##### (ii) ウイルス感染

前日 $1 \times 10^5$ /well. 2mlで6 well plateに撒いたNIH3T3細胞を、ポリブレン (hexa dimethrine bromide; sigma)  $10 \mu\text{g/ml}$ を添加したウイルス液1ml中で24時間培養した。その後フレッシュな培地1.5mlを加えさらに48時間培養を行い、その後遺伝子発現をFACSにより解析した。

### 【0075】

#### 〔7〕 免疫沈降

細胞をlysis buffer (0.5% Nonidet P-40, 10 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride,  $5 \mu\text{g/ml}$  aprotinin). で溶解したのち、遠心して不溶化蛋白を除きcell lysateとした。これに、2D7抗体  $1 \mu\text{g}$ を加え4度で4時間インキュベートし、引き続きmagnetic protein G (BioMagg)を加えさらに1時間インキュベートした。その後免疫複合体をlysis bufferで3回washしSDS-PAGEを行った。このゲルを添付のマニュアルに従って銀染色 (第一化学) した。一方ペプチドシーケンスするために、SDS-PAGE後のゲルをProBlott (Applied Biosystems) に転写し、クマシーブルー染色液 (0.1% coomassie blue R-250 in 40% MetOH/ 1% acetic acid) で一分間染色した。50% MetOHで数回洗浄した後目的のバンドを切り出し、1ml DDWで5回洗浄した後真空乾燥し、ペプチドシーケンサーにかけた。

## 【0076】

## 〔8〕 2D7抗体を用いた細胞増殖アッセイ

各細胞を96 well plateに  $1 \times 10^6$ /mlでPMA (50ng/ml; GIBCO), PHA ( $10 \mu$ l/ml; GIBCO) 存在下または非存在下で撒いた。そこに2D7抗体 ( $10 \mu$ g/ml) を添加または非添加後48時間培養した。培養後、細胞の形態変化を顕微鏡下で観察した。生細胞数測定は、WST-8 (生細胞数測定試薬SF; ナカライテスク) を添加し、37℃で2時間培養後、OD<sub>450</sub>をすることで相対的な生細胞数を測定した。

## 【0077】

## 〔9〕 cross-linkによる細胞死誘導

Jurkat細胞を  $8 \times 10^5$ /wellで24 wellplateに撒き、2D7抗体存在下 ( $5 \mu$ g/ml) または非存在下で、さらに抗マウスIgG (Fc)抗体 (Cappel)を  $10 \mu$ g/ml添加した。48時間後に細胞を回収し、PBSで洗浄後メタノールを70%濃度になるように加え、-20度で15分置いた。細胞をFACS Bufferで数回洗浄後、Hoechst33258を  $10 \mu$ g/ml濃度で添加し室温で30分インキュベートした。再度FACS Bufferで細胞を洗浄し、スライドガラスの上に細胞を滴下し蛍光顕微鏡で核の様子を観察した。

## 【0078】

## 〔10〕 2D7可変領域のクローニング

2D7ハイブリドーマ (徳島大学より供与) よりtotal RNAをTrizol (GIBCO) を用いて定法により精製した。このRNA  $3 \mu$ gを鋳型にして、SMART RACE cDNA Amplification kit (CLONTECH) を用い、添付のマニュアルに従ってcDNAを合成した。このcDNAを鋳型にしてheavy chain、light chainの可変領域を以下のプライマーを用いてPCR法により増幅を行った。

heavy chain: 5' - CAGGGGCCAGTGGATAGACTGATG (配列番号: 9)

light chain: 5' - GCTCACTGGATGGTGGGAAGATG (配列番号: 10)

増幅された各可変領域をコードするcDNAはpCR-TOPO vector (INVITROGEN) にサブクローニングし塩基配列 (配列番号: 1 および 3) を決定した。

## 【0079】

## 〔11〕 2D7 Diabody発現ベクターの作製

各可変領域cDNAをサブクローニングしたプラスミドを鋳型にしてHeavy chain

、及び、Light chainの可変領域 (VH, VL) をそれぞれ以下のプライマーにより増幅した。

#### Heavy chain

2D7DB-H1: 5' -CCTGAATTCCACCATGCGATGGAGCTGGATCTTTC (配列番号: 11)

2D7DB-H2: 5' -AATTTGGCTACCGCCTCCACCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGGCCCT (配列番号: 12)

#### Light chain

2D7DB-L1: 5' -TCCTCAGGTGGAGGCGGTAGCCAAATTGTTCTCACCCAGTCGCCAGC (配列番号: 13)

2D7DB-L2: 5' -ATTGCGGCCGCTTATCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAGTCTTTTATCTCCAACCTTG TCCCCGAGCC (配列番号: 14)

#### 【0080】

これにより増幅したVH、VLの各cDNAを一つのチューブに混合しさらにPCR反応を行った。このPCR productを鋳型にして、今度は2D7DB-H1, 2D7DB-L2をプライマーにして再度PCR反応を行い、VHとVLが5 merのリンカーをはさんで連結したcDNA (配列番号: 5) を合成した。このcDNAをEcoRI-NotI切断し、動物細胞発現ベクターpCXND3のEcoRI-NotI間に挿入した。塩基配列を確認し2D7 Diabody発現ベクターpCXND3-2D7DBの構築を終了した。

#### 【0081】

##### [12] COS7細胞での一過性発現

pCXND3-2D7DB、あるいはコントロールとして空のベクター 2 $\mu$ gに対してトランスフェクション試薬 (LT-1, MIRUS) 6 $\mu$ lを添付のマニュアルに従って混合し、無血清培地 (OPTI-MEM, GIBCO) に培地交換したCOS7細胞 (前日に1X10<sup>5</sup> cells/well で 6 well plateに撒いたもの) に添加した。5時間後に血清200 $\mu$ lを添加し2日から3日間培養した。その後培地を回収し、遠心により死細胞を除去した培養上清を細胞傷害活性の検出実験に用いた。

#### 【0082】

一方培養上清中の2D7 Diabody (2D7DB) の発現はウエスタンブロットにより確認した。すなわち、培養上清の一部に等量の2XSDS-PAGE Sample bufferを加え、ま

た細胞はlysis buffer (0.5% Nonidet P-40, 10 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) を加えて溶解したのち、遠心して不溶化蛋白を除きcell lysateを調整しこれに等量の2XSDS-PAGE Sample bufferを加えた。各サンプルをSDS-PAGE後、PVDF膜に転写し、抗FLAG抗体で2D7 Single chainの発現を検出した。

#### 【0083】

##### [13] 2D7 Diabody産生発現細胞株の樹立

PvuIで切断し直鎖化したpCXND3-2D7DB 20  $\mu$ gをCHO細胞 (DXB11株) に以下のよう electroporation法により導入した。

#### 【0084】

CHO細胞をice-cold PBSで2回洗浄した後 $1 \times 10^7$ /mlになるようにPBSに懸濁した。これに20  $\mu$ gの上記プラスミドを混合し、電気パルス (1.5KV, 25  $\mu$ FD) を与えた。適当な割合で細胞を希釈し10cm dishに撒きこみ、終濃度500  $\mu$ g/ml G418 (GIBCO) 存在下で培養を行った。生育したコロニーを $\sim 30$ クローンほどピックアップし、それら培養上清中のDiabodyの発現量をウエスタンブロットにより調べた。最も発現の高かったクローンを5nM MTXを含む核酸フリーのMEM  $\alpha$  培地に拡大後、これを高産生細胞株としてストックした。

#### 【0085】

##### [14] 2D7 Diabodyの大量精製

T-125フラスコでサブコンフルエントの2D7 DB高産生CHO細胞株をTrypsin-EDTAではがした後ローラーボトル (MEM  $\alpha$  without nucleotide + 5% FCS 250ml) に移した。4日後に培養液を除去しPBSで2回洗浄した。その後、無血清化するためにCHO-S-SFMII培地 (GIBCO) 250mlに置換し3日間培養を行った後培養上清を回収した。遠心によって死細胞を除去した後フィルターを通してこれを精製に用いた。

#### 【0086】

Single chain Fvの精製は以下のとおり行った。まず、Anti-Flag M2カラムに回収した培養上清をApplyし吸着させた。これをBuffer A (50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 0.01% Tween 20) でwashした後、Buffer B (100mM Glycine H3.5, 0.01% Tween 20) でSingle chain Fvを溶出した。回収したサンプルは直ちに終濃度25mMになるようにTris-HCl pH8.0で中和した。これをひき続きSuperdex200H



R (26/60) カラムによるゲルろ過精製に用いた。0.01% Tween 20を含むPBS中でSingle chain Fvのdimer fractionを回収した。回収したサンプルの一部をSDS電気泳動および銀染色を行い、目的の蛋白が精製されていることを確認した後これを濃縮し、2D7 Diabody精製標品とした。

#### 【0087】

##### 〔15〕 2D7 Diabodyによる細胞死誘導実験

各種血球系細胞株の場合は、 $2 \sim 5 \times 10^5$  cells/wellになるように24 well plateに細胞を撒いた。これに、精製した2D7DBを、あるいは2D7DBを一過性に発現させたCOS7の培養上清を加え細胞死誘導を行った。2D7DBを一過性に発現させたCOS7培養上清を用いた場合はその培養上清の濃度が50%になるように加えた。各wellとも培地の量は0.8~1ml/wellで行った。Jurkat細胞に刺激を加える場合は、2D7DBの添加時にCon A (WAKO)を終濃度  $2 \mu\text{g/ml}$ になるように同時に添加した。

#### 【0088】

付着細胞 (HeLa) の場合は、 $2 \times 10^5$  cells/wellになるように6 well plateに細胞を撒き一晚培養することで細胞を付着させた。その後培養液中に精製した2D7DBを添加した。

#### 【0089】

2D7DBを添加し数時間から数日経った後、浮遊細胞はそのまま細胞を回収し、付着細胞は1mM EDTA/PBSで細胞をはがして回収した後、ice-cold PBSで細胞をwashし、添付のマニュアルに従ってapoptosisマーカーであるAnnexin V、及び、死細胞マーカーであるPIで細胞をラベルした (TACS AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit, TREVIGEN Instructions)。その後、flow cytometryを用いて染色された細胞の割合を測定した (EPICS ELITE, COULTER)。

#### 【0090】

##### 〔16〕 Actinomycin Dによる細胞死誘導

各種血球系細胞を $2 \sim 5 \times 10^5$  cells/wellになるように24 well plateに撒いた。アポトーシスの初期過程を阻害する目的でcaspase阻害剤 (Z-VAD-FMK, プロメガ) を終濃度 $50 \mu\text{M}$ で添加し2.5時間インキュベートした後、細胞死誘導を行った。Actinomycin Dによる細胞死誘導ではActinomycin D (sigma) を $1 \mu\text{g/ml}$  (Jurk

at)、あるいは $5\mu\text{g/ml}$  (ARH77) 添加し、2D7DBによる細胞死誘導では精製2D7DBを $2\mu\text{g/ml}$ になるように添加した。細胞死誘導から16時間後に細胞を回収し、Annexin V、PIで細胞を染色した。

#### 【0091】

##### 〔17〕 2D7 Diabodyを用いた細胞増殖アッセイ

各細胞を96 well plateに  $1\sim 2\times 10^4/\text{well}$ の細胞濃度で撒いた。そこに2D7DBを適当な濃度になるように添加し3日培養後細胞数の測定を行った。生細胞数の測定は、WST-8 (生細胞数測定試薬SF;ナカライテスク) を用いて行った。すなわち本試薬を $10\mu\text{l}/\text{well}$ で細胞に添加し37時間で1.5時間培養後、分光光度計でOD<sub>450</sub>を測定することで相対的な生細胞数を測定した。増殖抑制率は、 $(1 - (\text{OD}_{450} \text{ of } 2\text{D7DB treated cells} / \text{OD}_{450} \text{ of } 2\text{D7DB untreated cells})) \times 100$ により算出した。

#### 【0092】

##### 〔18〕 DNAの断片化の検出

ARH77, Jurkat細胞を $2\times 10^6/\text{well}$ の細胞濃度になるように6well plateに撒き、それぞれのwellに精製2D7DBは終濃度 $2\mu\text{g/ml}$ で、Actinomycin Dは終濃度 $1\mu\text{g/ml}$  (ARH77)、あるいは $5\mu\text{g/ml}$  (Jurkat)になるように添加することで細胞死誘導を行った。また何も添加しない1wellをコントロールとした。24時間培養後細胞を回収しPBSで細胞を一回洗浄し、lysis buffer (10mM Tris pH7.5, 10mM EDTA, 0.5% Triton X-100)で溶解した。引き続き遠心することで不溶性蛋白を除いた後、これをRNase A, Proteinase K処理した。その後この一部をアガロースゲルで電気泳動を行い、クロマチンDNAの断片化を検出した。

#### 【0093】

##### 〔実施例1〕 各種細胞株における2D7抗原の発現解析

cDNA 発現library作製のためのsourceにすべき細胞株、および、宿主にすべき細胞株を決定するため、各種動物細胞における2D7抗原の発現をFACSにより解析した(図2)。その結果、ヒト由来血球系細胞ではリンパ性腫瘍細胞株RPMI8226, U266, 及び、Jurkatで2D7抗原の非常に強い発現が観察されたが、K562では発現が弱いことが分かった。マウス由来血球細胞であるBa/F3, FDC-P1, HCI-16で

は種の違いによるためか発現が非常に弱かった。付着細胞では、COS7, 293T, HeLaにおいても発現が認められた。マウスNIH3T3細胞では、ほとんど発現が見られなかった。

#### 【0094】

以上の発現パターンから、発現クローニングに使うcDNA libraryのSOURCE はRPMI8226細胞が、また発現libraryを導入してスクリーニングに使用する宿主細胞はNIH3T3細胞が適切であると判断した。

#### 【0095】

##### [実施例 2] 2D7抗原のクローニング

##### [1] 蛋白質からのクローニング

2D7抗原を発現しているRPMI8226細胞、U266細胞、および、2D7抗原を発現していないNIH3T3細胞よりcell lysateを調製し、2D7抗体で免疫沈降を行った。その結果、RPMI8226, U266細胞で特異的にprecipitateされる分子(～12kd)が確認された(図3)。この分子は2D7抗体によるwestern blotでは検出されないが、少なくとも2D7抗体では再現良くprecipitateされるので、2D7抗原そのもの、あるいは、2D7抗原との共沈分子であることが強く予想された。

#### 【0096】

そこで、このバンドをクマシー染色した後切り出し、ペプチドシーケンスを行った。その結果、この12kdの分子の正体は $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2M)であることが分かった。 $\beta$ 2MはHLA class Iと非共有結合で会合するクラスIMHC蛋白複合体の一つであることから、 $\beta$ 2Mは2D7抗体によりHLA 複合体として共沈してきたものと考えられる。HLA class Iは、抗原提示に必要な $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2 domain、及び、 $\beta$ 2Mと結合する $\alpha$ 3 domainから成る。2D7抗体が $\beta$ 2M分子を共沈できることから、2D7抗体はHLA class Iの $\alpha$ 1- $\alpha$ 2ドメインをエピトープとして認識していると予想される。

#### 【0097】

##### [2] 遺伝子の発現クローニング

2D7抗原発現細胞RPMI8226より精製したmRNAからランダムヘキサマーによりcDNAを合成した。これをレトロウイルスベクターpMX2に挿入し、レトロウイルス発

現ライブラリーを作製した。ライブラリーのタイターを調べた結果、トータルで  $6 \times 10^6$  clonesを含んでいることが分かった。また、このライブラリーより24個のクローンをランダムにピックアップしコロニーPCRによりインサートサイズを調べた結果、cDNA average lengthはおよそ 1.5kbであることが分かった。従って、作製した発現ライブラリーは発現クローニングに十分使用可能であると判断した。

#### 【0098】

図4に、以下のスクリーニングの流れを示す。一次スクリーニングでは4000個のindependentなクローンを1プールとして24プール(96000クローン相当)を作製し、各プラスミドをBOSC23細胞にトランスフェクトすることでレトロウイルスにパッケージングした。その後得られた各プール由来ウイルスをNIH3T3細胞に感染させた。感染3日後に細胞をはがし、2D7抗体で染色した後FACSにより発現解析を行った。その結果、空vector由来のウイルス(コントロール)を感染させたNIH3T3細胞と比較して2D7陽性細胞が認められたプールが24プール中3プールで認められた(プール4、13、21)。

#### 【0099】

次に一次スクリーニングで陽性だったプール4、プール13を1000個のindependentなクローンからなるプール4個に分割し二次スクリーニングを行った。その結果、各プールから一つずつ、明らかな陽性プールが認められた(図5A、プール4-4、プール13-1)。さらにプール13-1を160個のindependentなクローンからなるプール、21個に分割し、三次スクリーニングを行い、二つの陽性プール(図5B、13-1-11、13-1-21)を同定した。続いてプール13-1-11を20個のクローンからなるプール8個に分け四次スクリーニングを行い、陽性プール(図5C、13-1-11-5)を得た。

#### 【0100】

このプールをLB Plateに広げ64個のコロニーを一つずつ拾いそれぞれを96well plateに1wellずつ植菌した。縦の列8クローン分を1プールとして8プール(1~8)を、また横の列8クローン分を1プールとして8プール(A~H)を作製し、五次スクリーニングを行った。その結果、プール3,4,6,8及びプールE,F,Gがpositive

であったためこの結果から12個のpositive候補クローンを絞ることができた(図6A)。この12個についてFACSを行い、最終的に4つのpositiveクローン(3F, 4G, 6E, 8G)が2D7抗体に認識される単一クローンとして同定された(図6B)。

#### 【0101】

このクローンのインサート部分のシーケンスを読んだ結果、4つともHuman MHC class I HLA-A-6802の全長cDNA配列であることが分かった。

#### 【0102】

HLA-Aは数十種類ものハプロタイプに分類されている。今回のクローニングの結果、HLA class IのA\*6802というハプロタイプが2D7抗原として同定されたが、2D7抗体はかなり広範な細胞種を認識することから、遺伝子ソースとして使ったRPMI8226細胞でのHLA class IのハプロタイプがたまたまA\*6802だったというだけであって、2D7抗体は全てのハロタイプを含むHLA class I分子を認識する抗体であると考えられた。

#### 【0103】

[実施例3] 増殖抑制効果についての検討

2D7抗体が細胞殺傷作用を有しているかを、数種類のleukemia細胞株(K562, Jurkat, RPMI8226)を使って調べてみた。なお、これら三株での2D7抗原の発現量は、K562(弱陽性), Jurkat, RPMI8226(強陽性)であった。

#### 【0104】

K562, Jurkat細胞をPHAとPMA存在下、非存在下で撒き、そこに2D7抗体を10 $\mu$ g/mlで加えた。24時間後に細胞を観察した結果、2D7弱陽性であるK562細胞では2D7抗体の有無でその形態に目立った差は認められなかったが、2D7を強く発現しているJurkat細胞では2D7抗体の添加により著大な細胞凝集が観察された(図7B、C)。しかしながら、2D7抗体添加による増殖抑制は観察されなかった(図7A)。またPHA, PMA刺激により活性化させたJurkat細胞においても2D7による増殖抑制は同様に見られなかった。

#### 【0105】

さらに、2D7強陽性細胞であるRPMI8226細胞においては予想に反して2D7抗体を添加しても、細胞の形態、増殖に目立った影響を与えなかった(図7D)。

## 【0106】

次に、2D7抗体にさらに抗マウスIgG(Fc)抗体を加え、抗体をクロスリンクさせることで細胞殺傷効果が見られるか調べた。Jurkat細胞に2D7抗体存在下、非存在下で、さらに抗マウスIgGを加え培養を行い、48時間後、細胞核をHoechst33258で染色し死細胞に特長的な細胞核の断片化が認められるか観察した(図8)。その結果、Jurkat細胞において、2D7をさらに抗体でクロスリンクすることで核の断片化が観察され、細胞死が誘導されていることが分かった。

## 【0107】

【実施例4】 2D7抗体可変領域をコードするcDNAのクローニングおよび予想されるDiabodyの構造

マウスIgG2bのheavy chain, light chainの定常領域に対するプライマーを製作し、5' RACE法により2D7可変領域をコードするDNAのクローニングを行った。得られたPCR産物の塩基配列は配列番号：1および3に示したとおりである。

## 【0108】

続いてこの配列をもとにsingle chainの構築を行った。図9、10Aに示すように2D7 single chainは、heavy chainのリーダーシーケンス、heavy chainの可変領域、そして5merのリンカー(GGGGS)をはさんでlight chainの可変領域、その後ろにflag-tagをコードするcDNA(配列番号：5)から構成される。2D7 Diabodyはこのsingle chainがdimerizeすることで図10Bに示すような構造を形成すると考えられる。

## 【0109】

【実施例5】 2D7 Diabodyの細胞傷害活性解析

(i) COS7で一過性に発現させた2D7 Diabodyの傷害活性

2D7 Diabody発現ベクターをCOS7細胞にトランスフェクトし、3日後に培養上清を回収した。培養上清、及びcell lysateをSDS-PAGEし抗Flag-tag抗体でwestern blotを行った結果、培養上清中に2D7 single chainが分泌されていることが確認された(図10C)。

## 【0110】

この培養上清をJurkat細胞に50%の割合で添加し数日後に細胞をPI、及び、An

nexin Vで染色することで死細胞の割合を測定した。Jurkat細胞は、抗BST-1抗体、2D7抗体（各 $5\mu\text{g/ml}$ ）を添加しただけではapoptosisマーカーに大きな変動は認められなかった。また、ベクターのみをトランスフェクトしたCOS7の培養上清でも特に変化は認められなかった。一方、2D7 DBを発現させたCOS7の培養上清を加えたJurkat細胞では、明らかな細胞死誘導が認められた（図11）。

#### 【0111】

次に、この2D7 DBがHLA class I A特異的に作用していることを調べる目的で、HLA class I Aを発現していないことが知られているK562細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、2D7 DBはJurkat細胞に対しては細胞死誘導活性を認めたものの、K562細胞に対しては全く影響を及ぼさなかった（図12）。このことから2D7 DBの細胞死誘導活性はそのエピトープであるHLA class I Aを標的にした作用であることが強く支持された。また、Jurkat細胞の2D7 DBに対する感受性はcon Aで刺激した細胞の方が若干ではあるが高いような傾向が各データから認められた。

#### 【0112】

次に他のmyeloma細胞株に対する2D7 DBの作用を解析した。RPMI8226, IL-KM3, U266, ARH77をベクターのみをトランスフェクトした培養上清（コントロール）、あるいは2D7 DB発現COS7培養上清とインキュベートし、二日後にAnnexin V, PIで二重染色しFlow cytometerで解析した。その結果いずれの細胞も2D7 DBとのインキュベートにより顕著に細胞死が誘導されることが明らかになった（図13）。

#### 【0113】

##### (ii) 精製した2D7 DBの細胞傷害活性

精製した2D7 DBの各種細胞株（RPMI8226, ARH77, U266, Jurkat）に対する増殖抑制効果について解析した。2D7 DBを0, 0.5 1.0 2.0  $\mu\text{g/ml}$ で添加し3日後に細胞数を測定した。その結果、これらの細胞に対して濃度依存的に細胞増殖を抑制することが分かった（図14）。

#### 【0114】

次に、精製2D7 DBを添加し48時間後に細胞死マーカーであるPI, Annexin Vで

染めて解析を行った。その結果、COS7で一過性に発現させた2D7 DBを用いた時の結果と同様にJurkat、ARH77に対して濃度依存的に細胞死を誘導し、K562にはまったく影響を与えないことが明らかになった(図15)。またU266, IL-KM3に対しても2D7DB添加48時間後に著しい細胞死誘導活性が認められた(図16)。

#### 【0115】

一方、付着細胞であるHeLa細胞に対しては、この細胞は2D7抗体で非常によく染色されるにも関わらず、同条件で2D7 DBは全く影響を及ぼさなかった(図15)。このことから、2D7 DBは血球系細胞など浮遊細胞にのみ特異的に作用する可能性が示唆された。

#### 【0116】

続いて、2D7 DBによる細胞死誘導活性がどれくらいの時間で誘導されるか解析した。ARH77, Jurkat細胞に2D7 DBを $2\mu\text{g/ml}$ で添加し、12、24、38時間後に細胞を回収し、細胞死マーカーで染色した。その結果、いずれの細胞も12時間後で既に細胞死が誘導されていることが判った(図17)。そこで、さらに早い時間(3時間、6時間)における細胞死誘導を調べた。驚いたことに2D7 DBは添加してから少なくとも3時間以内に細胞死を誘導することが実験から明らかになった(図18)。これらの結果から2D7 DBは非常に強力な細胞死誘導活性を有することが強く支持された。このように2D7 DBは強力に細胞死を誘導するので、短い血中半減期でも十分な薬効が期待できる。さらに、whole抗体が仮に強力な細胞死誘導活性を有した場合には、血中半減期の長さから安全性の問題が懸念されるが、Diabody化することにより、そのような問題もクリアされることが考えられる。

#### 【0117】

最後に、2D7 DBによる細胞死がcaspaseの活性化を伴って引き起こされる、いわゆるapoptosisによるものかどうかについて解析を行った。図19、20で示すようにARH77, Jurkat細胞をapoptosis誘導剤であるActinomycin Dで処理し16時間後にAnexin V, PIで細胞を染色すると顕著にapoptosisが誘導された。この条件下であらかじめ細胞をcaspase阻害剤であるZ-VAD-FMKで2.5時間前処理するとActinomycin Dによるapoptosisは抑制された。ところが、2D7 DBによって誘導される細胞死はZ-VAD-FMKによる前処理を行ってもまったく阻害されなかった。



これらの結果から、2D7 DBはcaspaseを介した通常のapoptosisの機構とは異なる別の機構によって細胞死を誘導していることが明らかになった。

#### 【0118】

さらにこのことを確認するため、apoptosisに伴う最も特徴的生化学的变化として知られているクロマチンDNAの断片化に関しても解析を行った。

#### 【0119】

ARH77, Jurkat細胞を2D7DB(2ug/ml)、あるいはActinomycin Dで処理し24時間後にDNAを回収し、電気泳動を行った(図21)。その結果、apoptosis誘導剤であるActinomycin D処理した細胞はいずれもapoptosisの特徴であるDNAの断片化が誘導されていたが、その一方で、2D7DB処理した細胞では完全に細胞死を誘導しうる濃度の2D7DBを添加しているにも関わらずDNAの断片化は全く認められなかった。この結果からも、2D7DBによる細胞死は、apoptosisの特徴を伴わない未知の細胞死であることが強く支持された。

#### 【0120】

##### 【発明の効果】

本発明によって、高比活性の低分子化抗体を提供できるものと期待される。該低分子化抗体を使用することで、短い半減期でも十分な薬効が期待でき、さらに、薬効と毒性の乖離が可能になるものと期待できる。また、臨床投与量の低減化および生産コストの低減化など、コスト全体の低減化が図れるので抗体医薬品の開発上問題になる経済面問題の改善もまた期待される。

#### 【0121】

##### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

Shuji Ozaki

Masahiro Abe

<120> Inducer Of Cell Death

<130> C1-A0220

<140>

<141>

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 547

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (103)..(546)

<400> 1

tacgactcac tatagggcaa gcagtgggtat caacgcagag tacgcgggga atctatgata 60

agtgctcctct ctacacagtc cctgacgaca ctgactccaa cc atg cga tgg agc 114

Met Arg Trp Ser

1

tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca ata act gca ggt gtc cat tgc cag 162

Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Thr Ala Gly Val His Cys Gln

5

10

15

20

gtc cag ttg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct tca 210

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser

25

30

35

gtg aag atg tct tgt aag gct tct ggc tac acc ttc aca gac tac ttt 258

Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Phe

40

45

50

ata cac tgg gtg aaa cag agg cct gga cag gga ctt gaa tgg att gga 306

Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

55

60

65

tgg att ttt cct gga gat gat act act gat tac aat gag aag ttc agg 354

Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Arg

70

75

80

ggc aag acc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac att 402

Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile

85

90

95

100

ttg ctc agc agc ctg acc tct gag gac tct gcg atg tat ttc tgt gta 450

Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Val

105

110

115

agg agt gac gac ttt gac tac tgg ggc cag ggc acc act ctc aca gtc 498

Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val

120

125

130

tcc tca gcc aaa aca aca ccc cca tca gtc tat cca ctg gcc cct gct g 547

Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Ala

135

140

145

<210> 2

<211> 148

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Thr Ala Gly

1

5

10

15

Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys

20

25

30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35

40

45

Thr Asp Tyr Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn

65

70

75

80

Glu Lys Phe Arg Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85

90

95

Thr Ala Tyr Ile Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met  
100 105 110

Tyr Phe Cys Val Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
115 120 125

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro  
130 135 140

Leu Ala Pro Ala  
145

<210> 3

<211> 535

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (103)..(534)

<400> 3

ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagtacgcg gggactwatg 60

agaatagcag taattagcta gggaccaaaa ttcaaagaca aa atg cat ttt caa 114

Met His Phe Gln

1

gtg cag att ttc agc ttc ctg cta atc agt gcc tca gtc atc atg tcc 162

Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile Met Ser

5

10

15

20

aga gga caa att gtt ctc acc cag tcg cca gca atc atg tct gca tct 210

Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser

25

30

35

cca ggg gag aag gtc acc ata acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt 258

Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser

40

45

50

tac atg cac tgg ttc cag cag aag cca ggc act ttt ccc aaa ctc tgg 306

Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe Pro Lys Leu Trp

55

60

65

att tat agc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct act cgc ttc agt 354

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser

70

75

80

ggc agt gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc cga atg gag 402

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu

85

90

95

100

gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cag caa agg acg agt tat cca 450

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Ser Tyr Pro

105

110

115

ccc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gag ata aaa cgg gct gat gct 498  
Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala  
120 125 130

gca cca act gta tcc atc ttc cca cca tcc agt gag c 535  
Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
135 140

<210> 4

<211> 144

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser  
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe  
50 55 60

Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
65 70 75 80

Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

85

90

95

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg

100

105

110

Thr Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115

120

125

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu

130

135

140

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 789

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (14)..(775)

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized DNA sequence

&lt;400&gt; 5

cctgaattcc acc atg cga tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca 49

Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser

1

5

10



ata act gca ggt gtc cat tgc cag gtc cag ttg cag cag tct gga cct 97  
Ile Thr Ala Gly Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro  
15 20 25

gag ctg gtg aag cct ggg gct tca gtg aag atg tct tgt aag gct tct 145  
Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser  
30 35 40

ggc tac acc ttc aca gac tac ttt ata cac tgg gtg aaa cag agg cct 193  
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro  
45 50 55 60

gga cag gga ctt gaa tgg att gga tgg att ttt cct gga gat gat act 241  
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr  
65 70 75

act gat tac aat gag aag ttc agg ggc aag acc aca ctg act gca gac 289  
Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Arg Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp  
80 85 90

aaa tcc tcc agc aca gcc tac att ttg ctc agc agc ctg acc tct gag 337  
Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu  
95 100 105

gac tct gcg atg tat ttc tgt gta agg agt gac gac ttt gac tac tgg 385  
Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Val Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp  
110 115 120

ggc cag ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt gga ggc ggt agc caa 433  
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln  
125 130 135 140

att gtt ctc acc cag tcg cca gca atc atg tct gca tct cca ggg gag 481  
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu  
145 150 155

aag gtc acc ata acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt tac atg cac 529  
Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His  
160 165 170

tgg ttc cag cag aag cca ggc act ttt ccc aaa ctc tgg att tat agc 577  
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser  
175 180 185

aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct act cgc ttc agt ggc agt gga 625  
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
190 195 200

tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc cga atg gag gct gaa gat 673  
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp  
205 210 215 220

gct gcc act tat tac tgc cag caa agg acg agt tat cca ccc acg ttc 721  
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Ser Tyr Pro Pro Thr Phe  
225 230 235

ggc tcg ggg aca aag ttg gag ata aaa gac tac aag gat gac gac gat 769

Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp  
 240 245 250

ag tga taagcgccg caat

789

Lys

<210> 6

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
 synthesized peptide sequence

<400> 6

Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Asp Tyr Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Lys Phe Arg Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Ile Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met  
 100 105 110  
 Tyr Phe Cys Val Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 115 120 125  
 Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr  
 130 135 140  
 Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile  
 145 150 155 160  
 Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln  
 165 170 175  
 Lys Pro Gly Thr Phe Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu  
 180 185 190  
 Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser  
 195 200 205  
 Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr  
 210 215 220  
 Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr  
 225 230 235 240  
 Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 245 250

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

synthesized adapter sequence

<400> 7

aattcccagc acagtggtag ataagtaag

29

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized adapter sequence

<400> 8

tgcattact tatctaccac tgtgctggg

29

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 9

caggggccag tggatagact gatg

24

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 10

gctcactgga tgggtgggaag atg

23

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 11

cctgaattcc accatgcat ggagctggat ctttc

35

<210> 12

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 12

aatttggcta ccgcctccac ctgaggagac tgtgagagtg gtgccct

47

<210> 13

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 13

tcctcaggtg gaggcggtag ccaaattgtt ctcacccagt cgccagc

47

<210> 14

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 14

attgcggccg cttatcactt atcgtcgtca tccttgtagt cttttatctc caactttgtc 60  
cccgagcc 68

【図面の簡単な説明】

【図 1】 pMX2ベクターの作製に用いたアダプターを示す図である。網掛け部分はBstXI認識配列を示している。

【図 2】 2D7抗原の細胞株における発現を示す図である。2D7抗体で各種細胞を染色し、その発現を調べた。（実線：一次抗体なし、点線：2D7抗体）

【図 3】 2D7抗体による免疫沈降を示す写真である。NIH3T3, RPMI8226, U266細胞を可溶化し、2D7抗体、抗BST-1抗体（CONTROL）, またはProtein Gのみで免疫沈降を行い、銀染色で蛋白を検出した。RPMI8226, U266で2D7抗体により特異的に沈降する約12KDの分子（矢印）が検出された。このバンドを切り出し、ペプチドシーケンスを行った結果、 $\beta$ 2-microglobulinであることが分かった。

。【図 4】 スクリーニングの流れを示す図である。（A）プール分け、DNAの調製、ウイルスへのパッケージング、3T3細胞への感染、FACSによるスクリーニングまでを一つのスパンとして行った。（B）四次スクリーニング終了までに約20クローンにまで絞った。五次スクリーニングでは、コロニー64個をそれぞれ96 wellプレートに植菌し、縦の列、横の列でプールを作りスクリーニングを行った。その結果、12個の候補クローンが絞れた。

【図 5】 FACSによるスクリーニングの結果を示す図である。（A）は二次スクリーニングの結果を、（B）は三次スクリーニングの結果を、（C）は四次



スクリーニングの結果を示している。各プールよりレトロウイルスを調製後NIH3T3に感染させ3日後に2D7抗体で細胞を染色した。スクリーニングごとにプールのサイズを徐々に小さくすることでクローンを絞っていった。

【図 6】 FACSによるスクリーニングの結果を示す図である。(A)は五次スクリーニングの結果を、(B)は最終スクリーニングの結果を示している。五次スクリーニングの結果、3,4,6,8の列、E,F,Gの列に陽性クローンが含まれていることが分かった。12個の候補クローンをスクリーニングした結果、Eの列では6Eが陽性クローンであることが分かった。この6Eの塩基配列を解析した結果HLA class I A\*6802をコードしていた。

【図 7】 2D7抗体添加による細胞への影響を示す図及び写真である。(A) 2D7抗体 (10  $\mu$ g/ml) 添加後、48時間後に生細胞数を測定した。2D7抗体を加えても、細胞増殖にほとんど変化が見られなかった。(B)はK562細胞を、(C)はJurkat細胞を、(D)はRPMI8226細胞をそれぞれ抗体添加24時間後に観察した写真である。2D7抗体はJurkatに対して細胞凝集を誘導した。

【図 8】 2D7抗体のcross-linkによる細胞死誘導を示す写真である。Jurkat細胞に2D7抗体、抗マウスIgGを各組み合わせで作用させ、48時間後に細胞核を染色した。2D7抗体と抗マウスIgGを同時に作用させることにより、細胞死による核の断片化が観察された。

【図 9】 2D7 Diabodyの配列を示した図である。

【図 10】 (A) (B) 2D7 Diabodyの構造を示した図である。(C) COS7での一過性発現を示した写真である。

【図 11】 COS7で一過性に発現させた2D7 DBの細胞傷害活性を示した図である。

【図 12】 COS7で一過性に発現させた2D7 DBの細胞傷害活性を示した図である。(A)はK562細胞を、(B)はJurkat細胞を用いて行った。

【図 13】 COS7で一過性に発現させた2D7 DBの細胞傷害活性を示した図である。(A)はRPMI8226細胞を、(B)はIL-KM3細胞を、(C)はU266細胞を、(D)はARH77細胞を用いて行った。

【図 14】 精製2D7 DBの増殖抑制効果を示した図である。

【図 1 5】 誘導48時間後における精製2D7 DBによる細胞死誘導を示した図である。(A)はARH77細胞を、(B)はJurkat細胞を、(C)はK562細胞を、(D)はHeLa細胞を用いて行った。

【図 1 6】 誘導48時間後における精製2D7 DBによる細胞死誘導を示した図である。(A)はU266細胞を、(B)はIL-KM3細胞を用いて行った。

【図 1 7】 2D7 DB ( $2\mu\text{g/ml}$ ) による細胞死誘導のタイムコースを示した図である。12時間から38時間における細胞死誘導を調べた。

【図 1 8】 2D7 DB ( $2\mu\text{g/ml}$ ) による細胞死誘導のタイムコースを示した図である。3時間から6時間における細胞死誘導を調べた。

【図 1 9】 2D7 DBによる細胞死に対するZ-VAD-FMKの効果を示した図である。ARH77細胞を用いて、誘導後16時間に行った。

【図 2 0】 2D7 DBによる細胞死に対するZ-VAD-FMKの効果を示した図である。Jurkat細胞を用いて、誘導後16時間に行った。

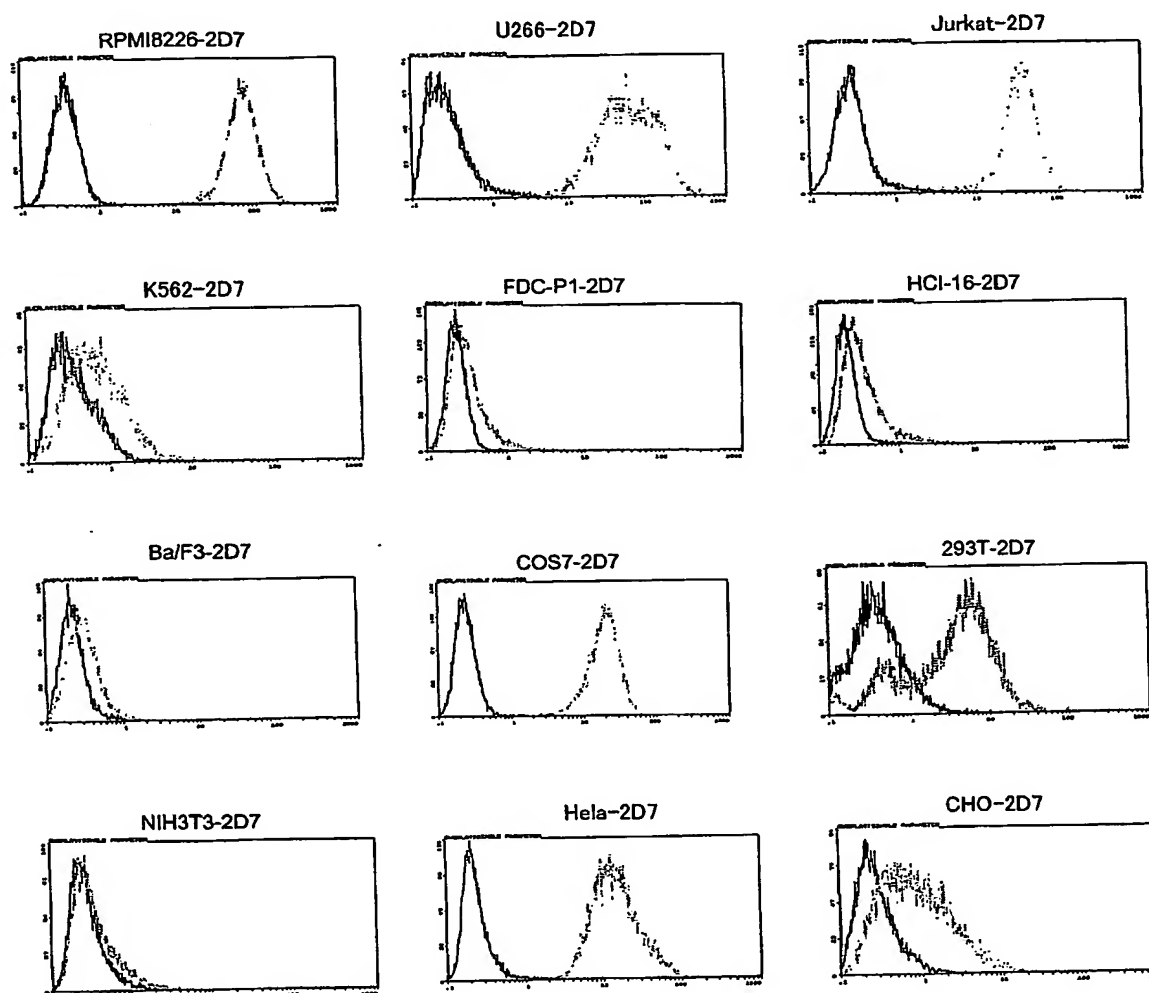
【図 2 1】 2D7 DBによる細胞死がDNAの断片化に伴わないことを示した写真である。細胞死誘導後24時間後に行った。

【書類名】 図面

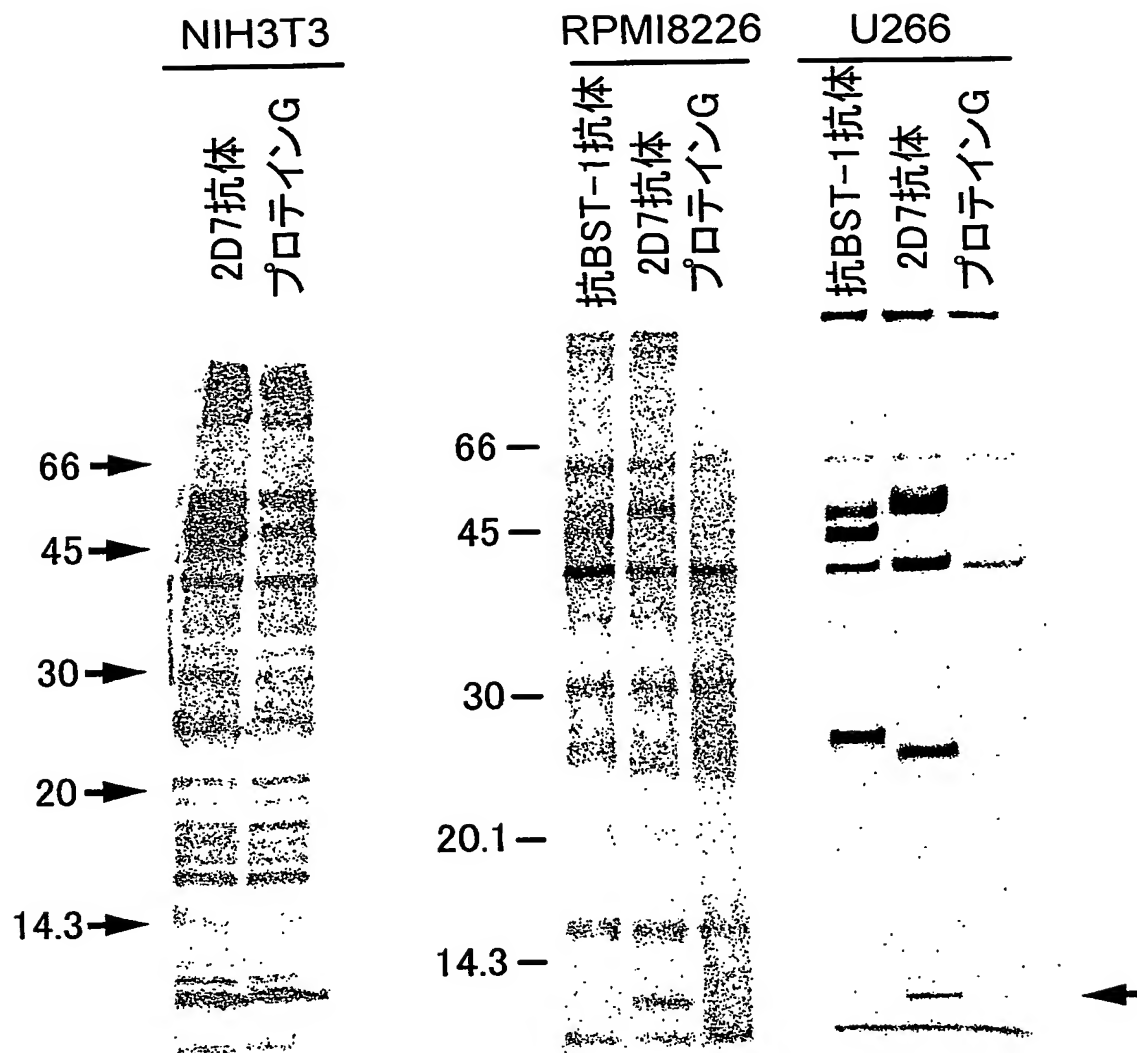
【図 1】

5' -AATTCCCAGCACAGTGGTAGATAAGTAAG (配列番号:7)  
GGGTCGTGTCACCATCTATTCATTCAGCT-5' (配列番号:8)

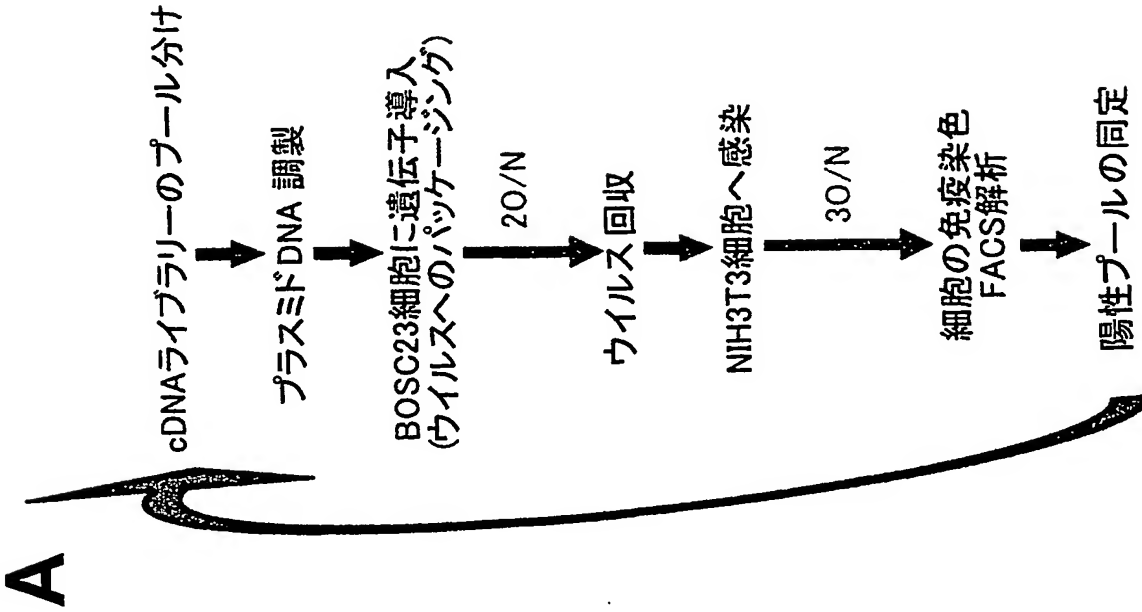
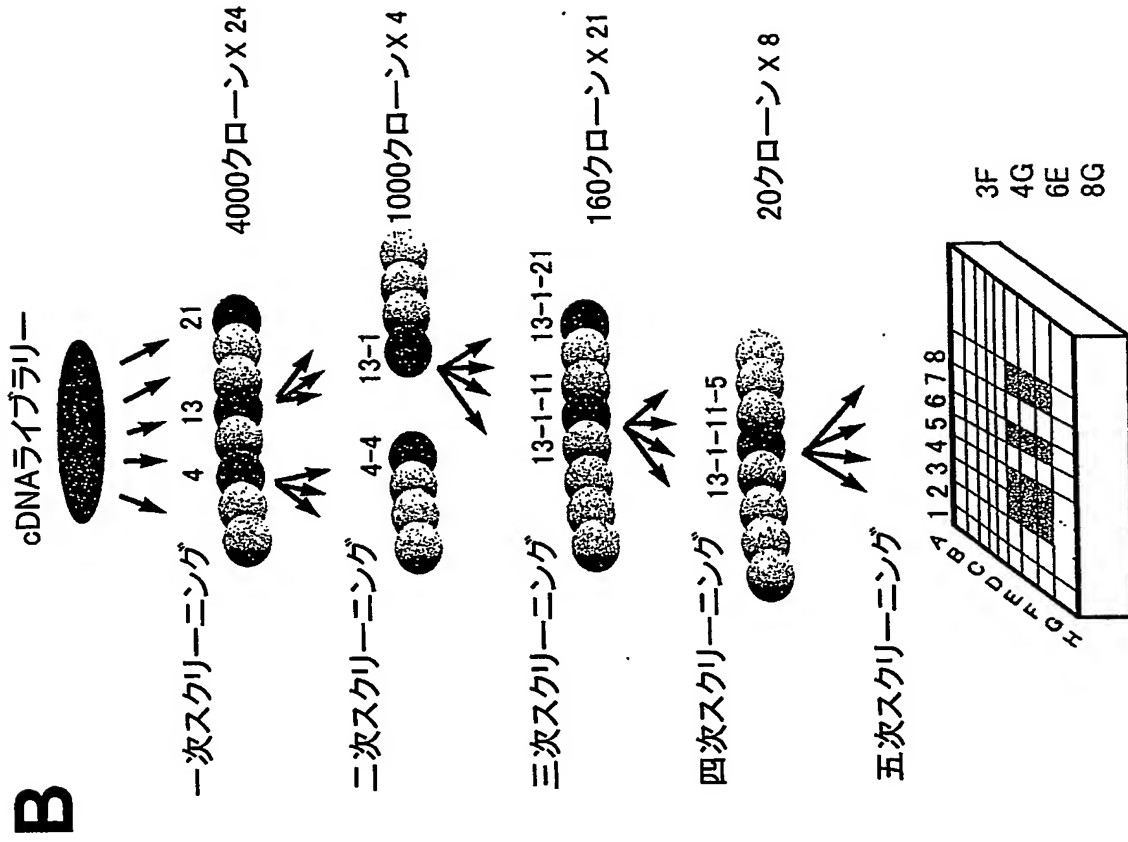
【図 2】



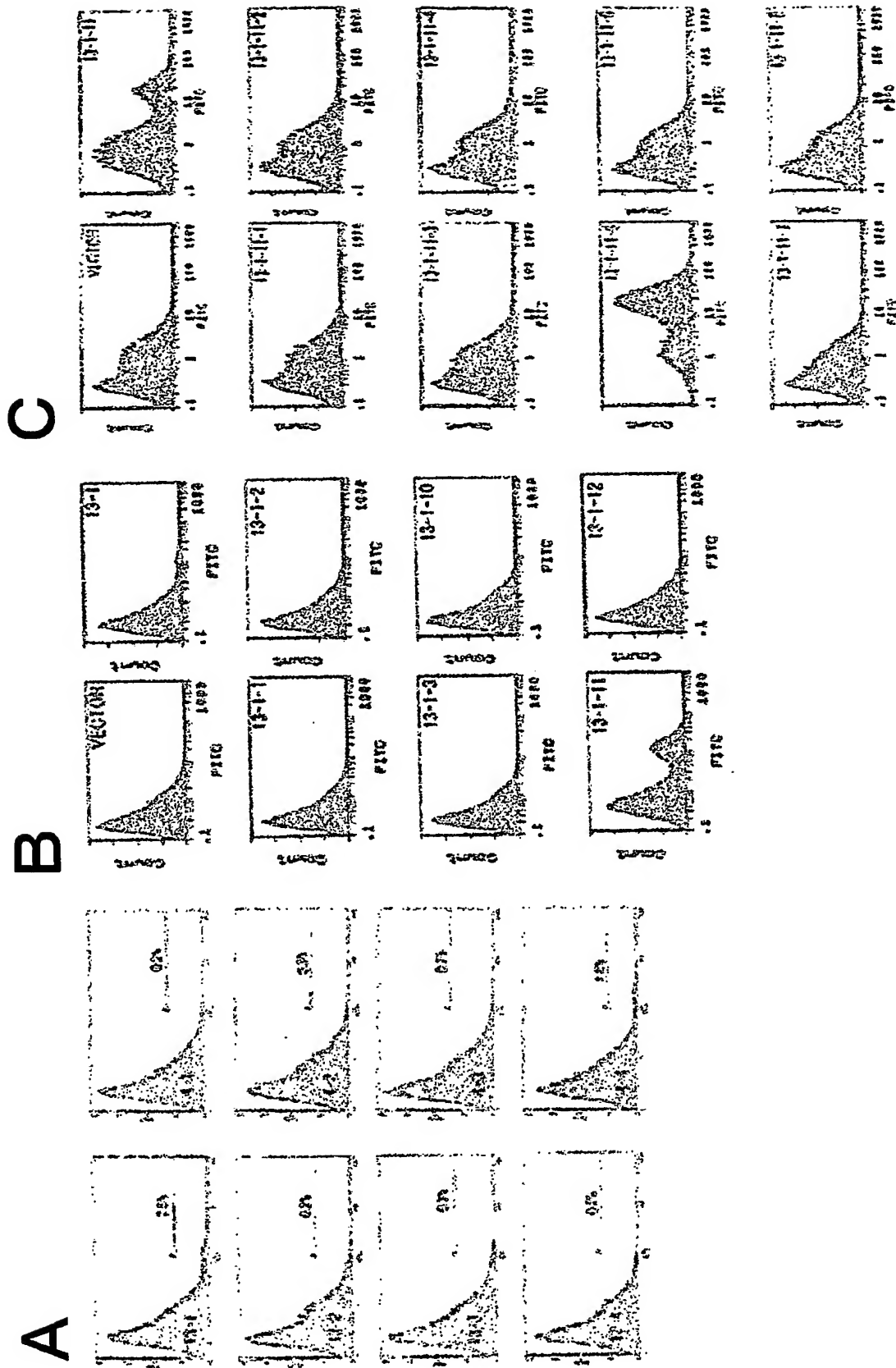
【図 3】



【図 4】

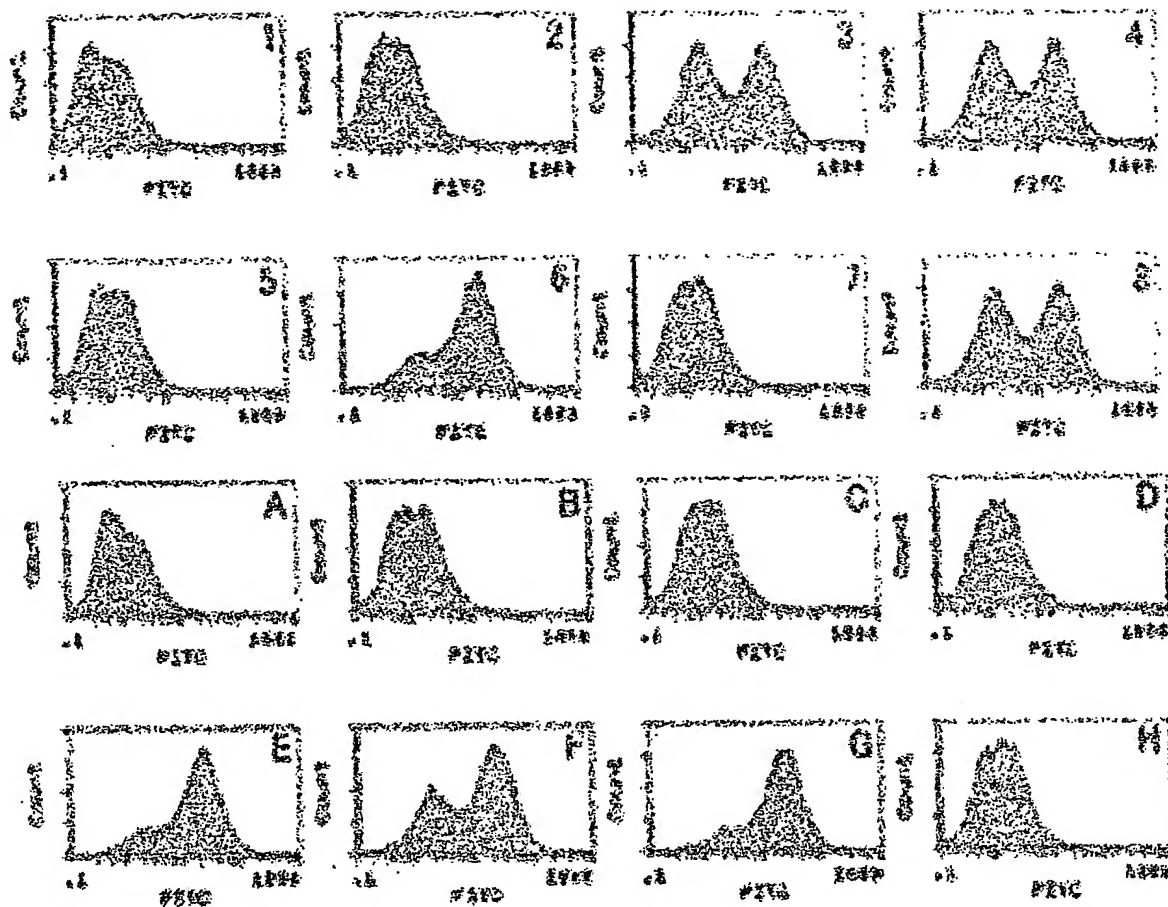


【図 5】

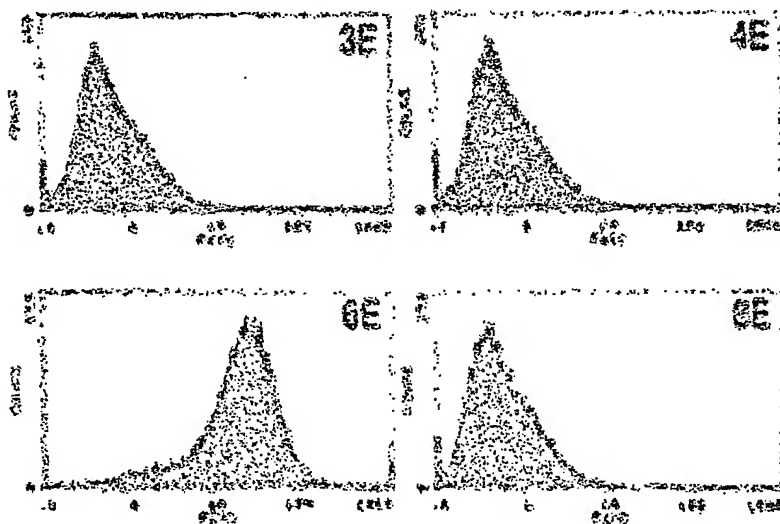


【図6】

A

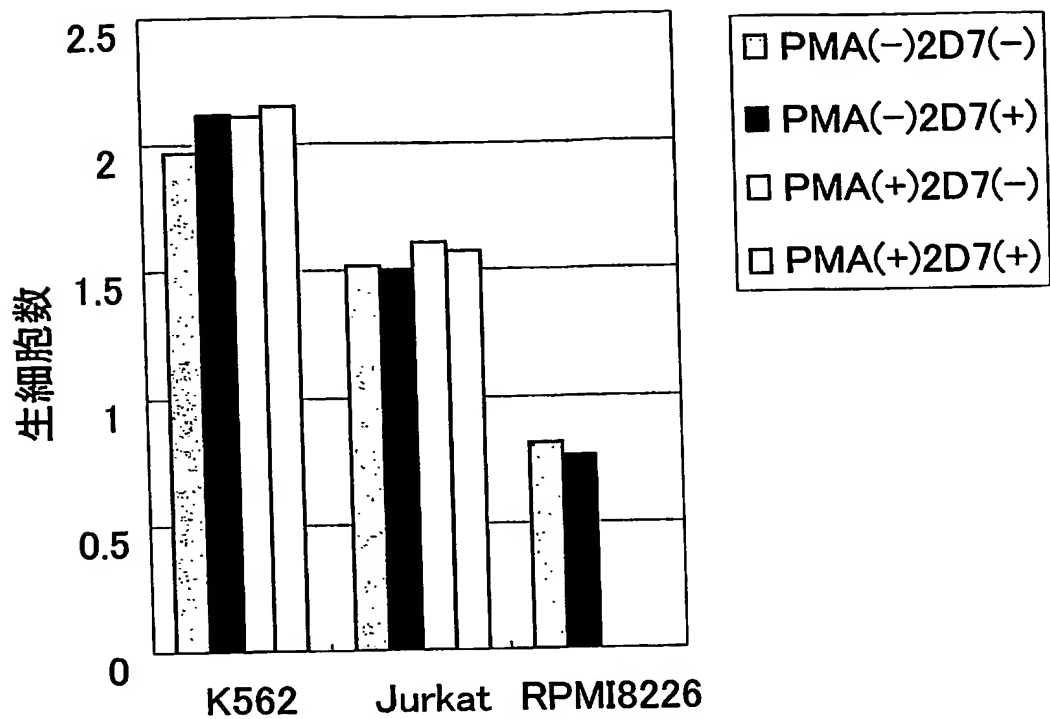


B

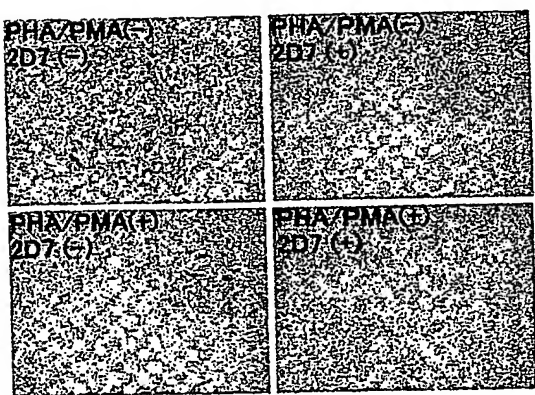


【図7】

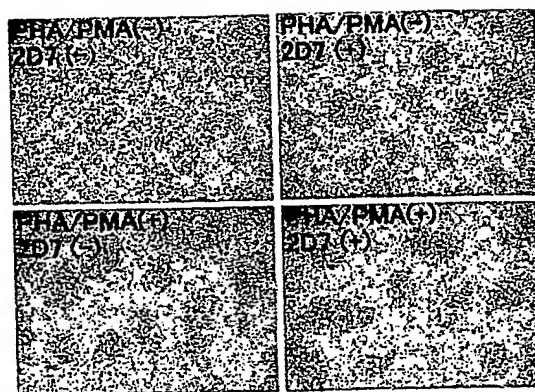
A



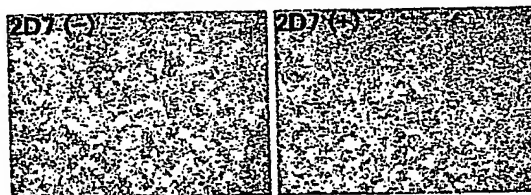
B



C



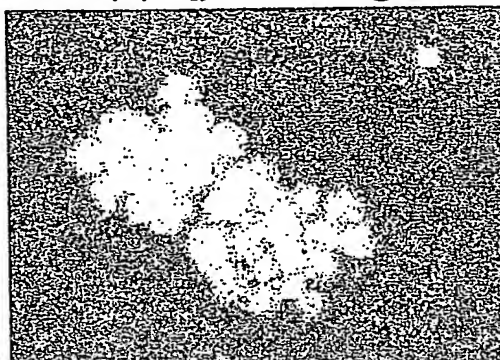
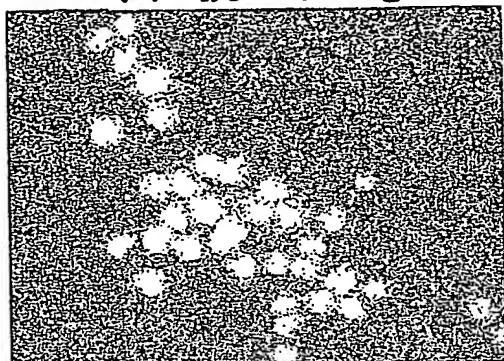
D





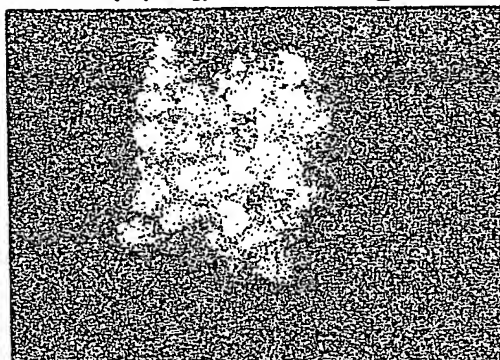
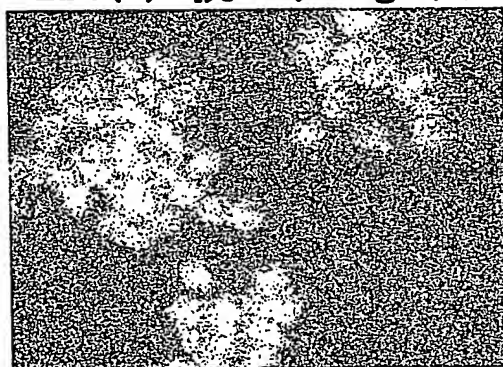
【図 8】

2D7(-) 抗マウスIgG(-)      2D7(-) 抗マウスIgG(+)



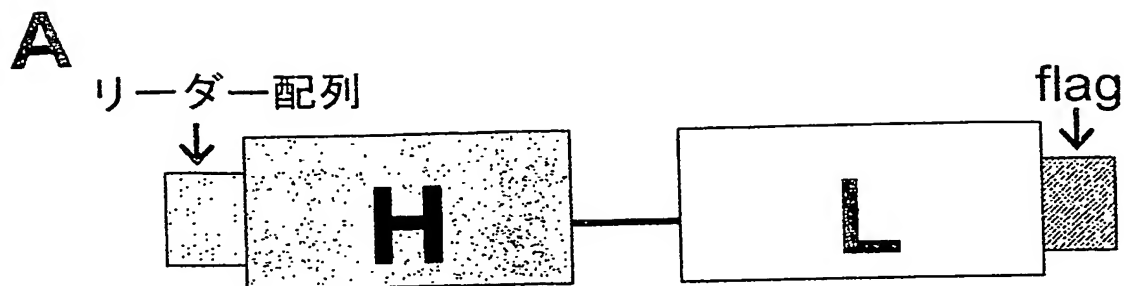
2D7(+) 抗マウスIgG(-)

2D7(+) 抗マウスIgG(+)

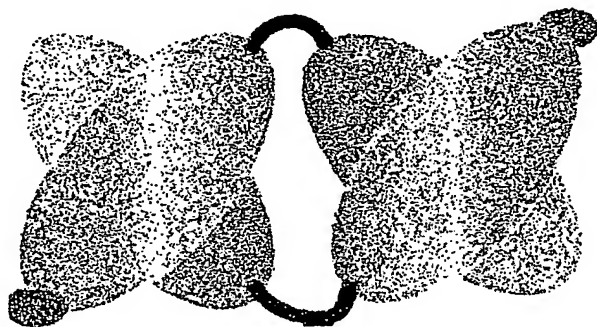




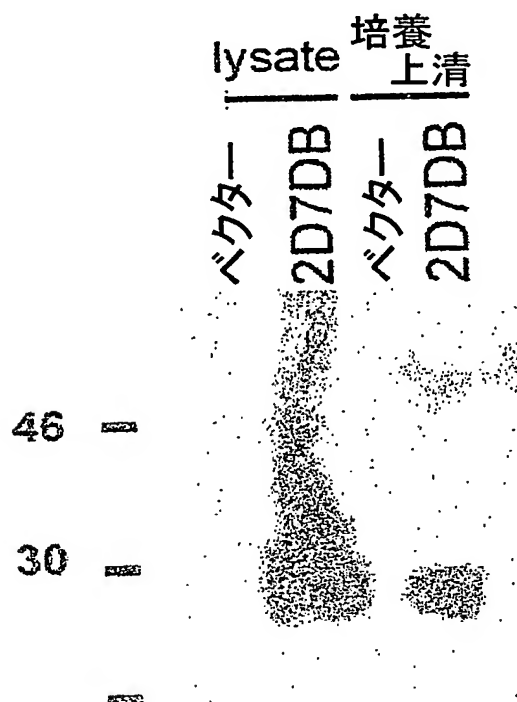
【図10】



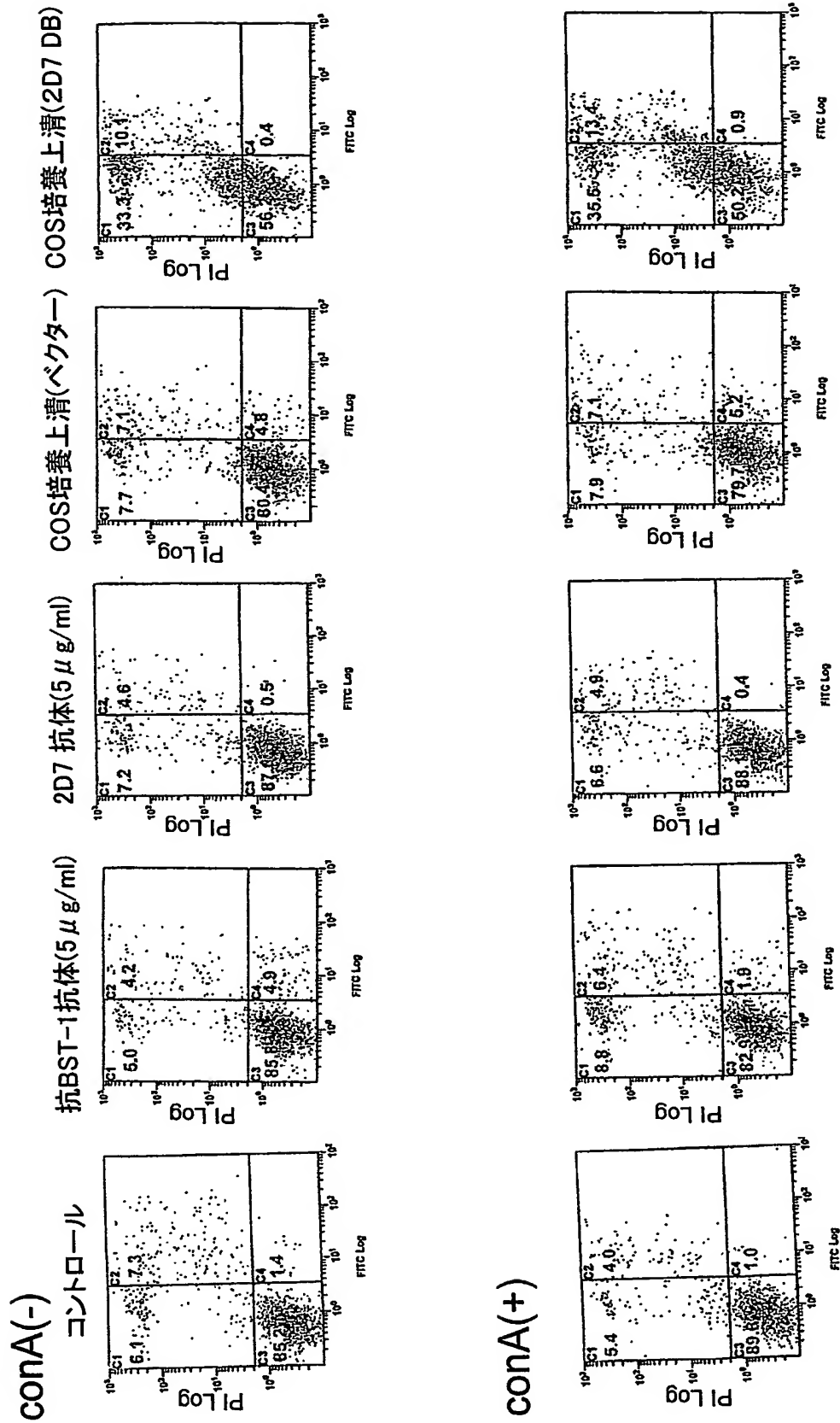
**B**



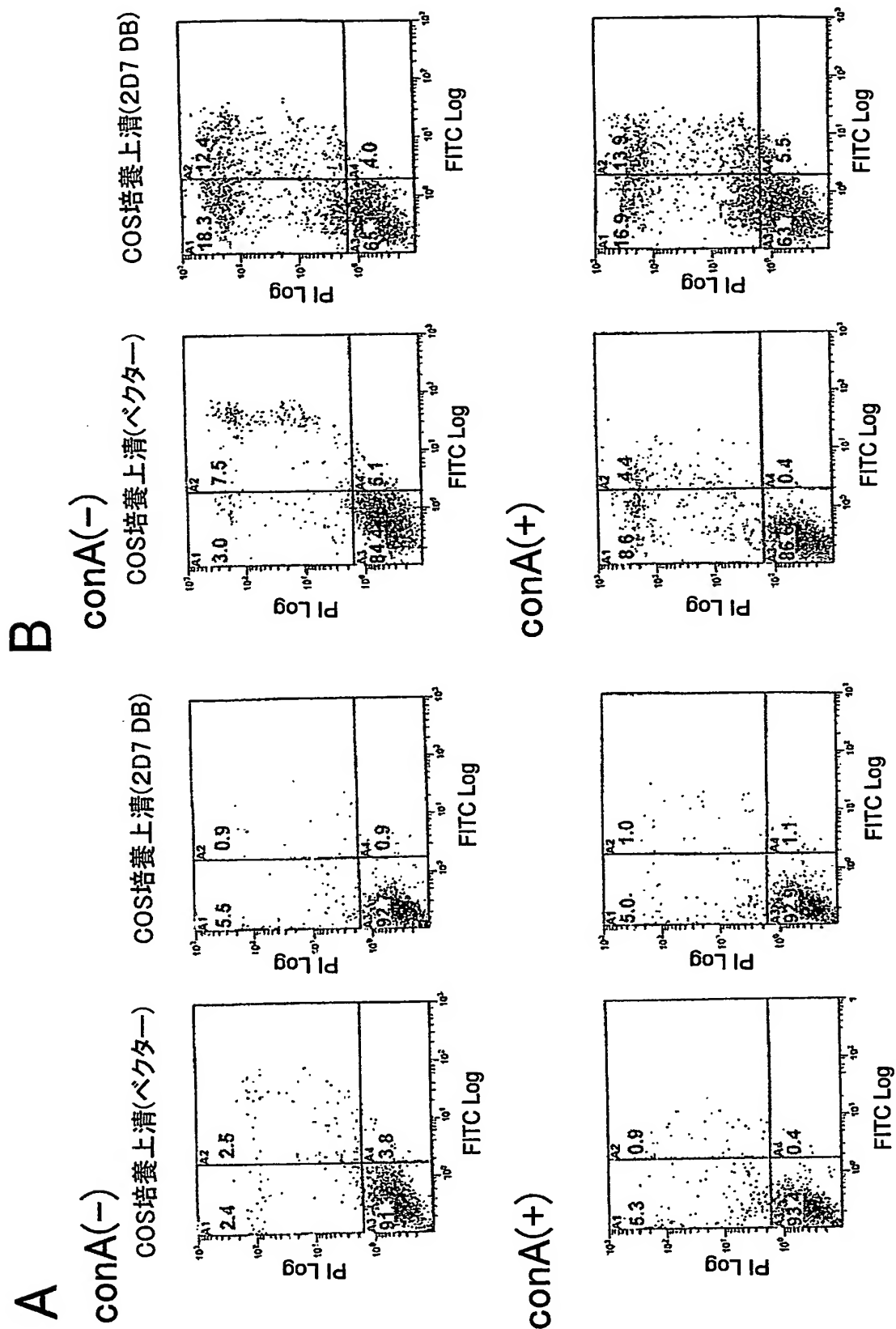
**C**



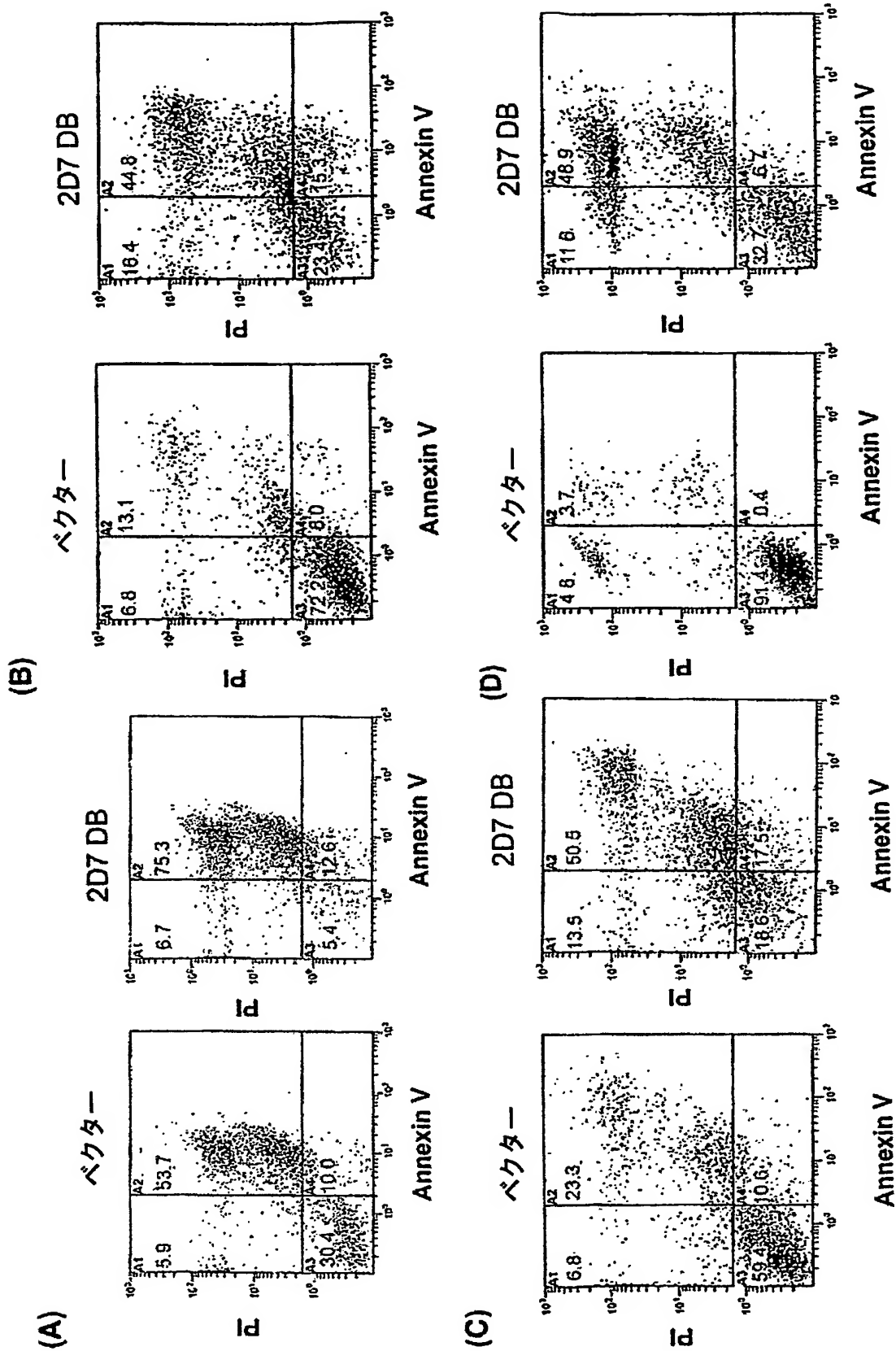
【図 11】



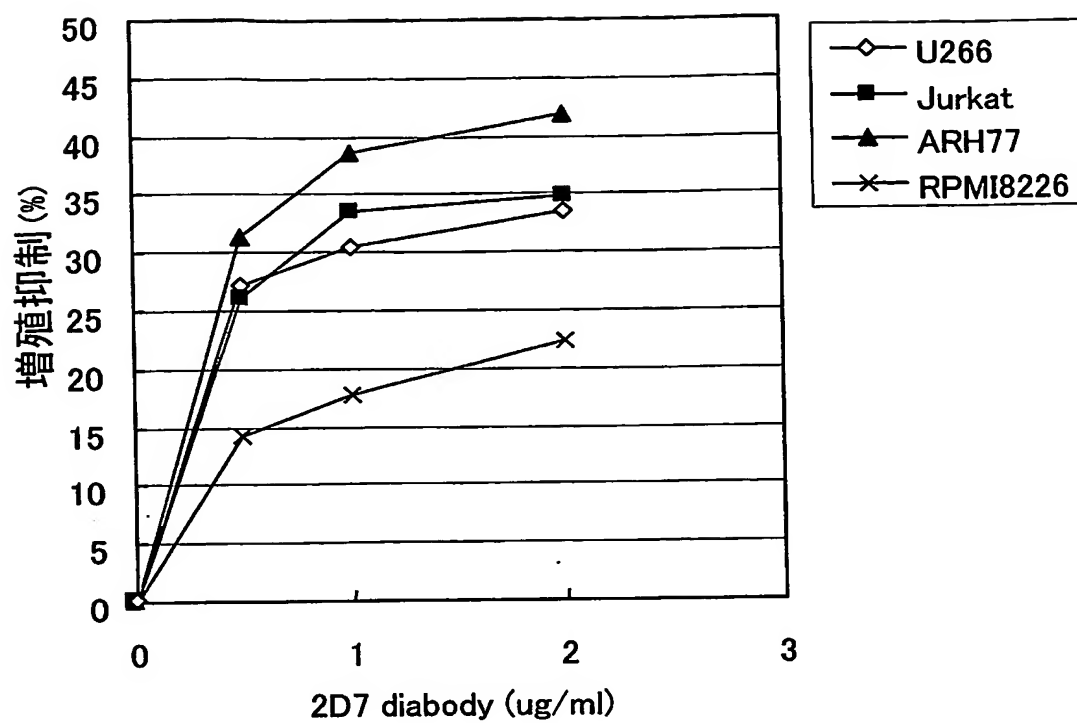
【図 12】



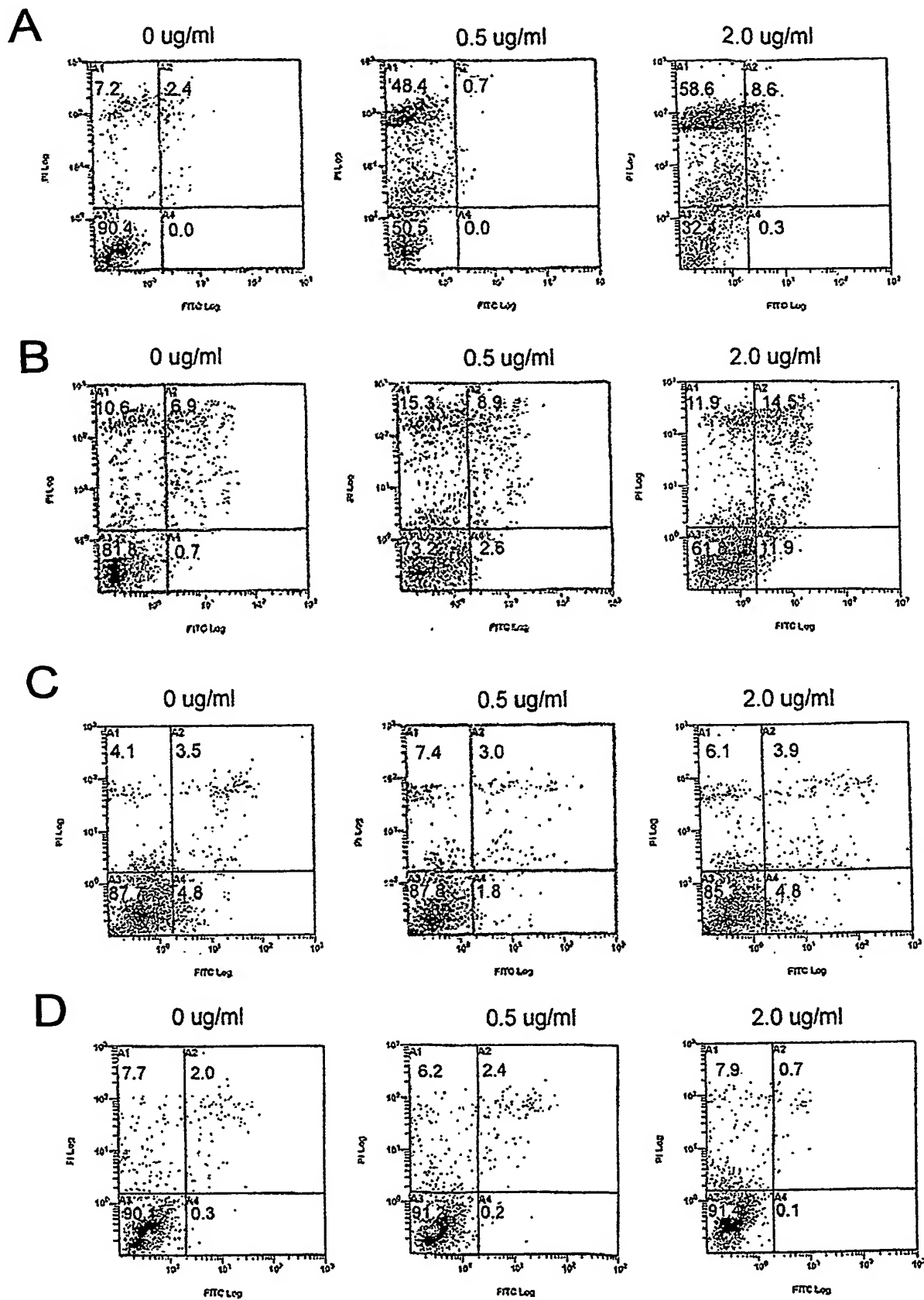
【図13】



【図14】



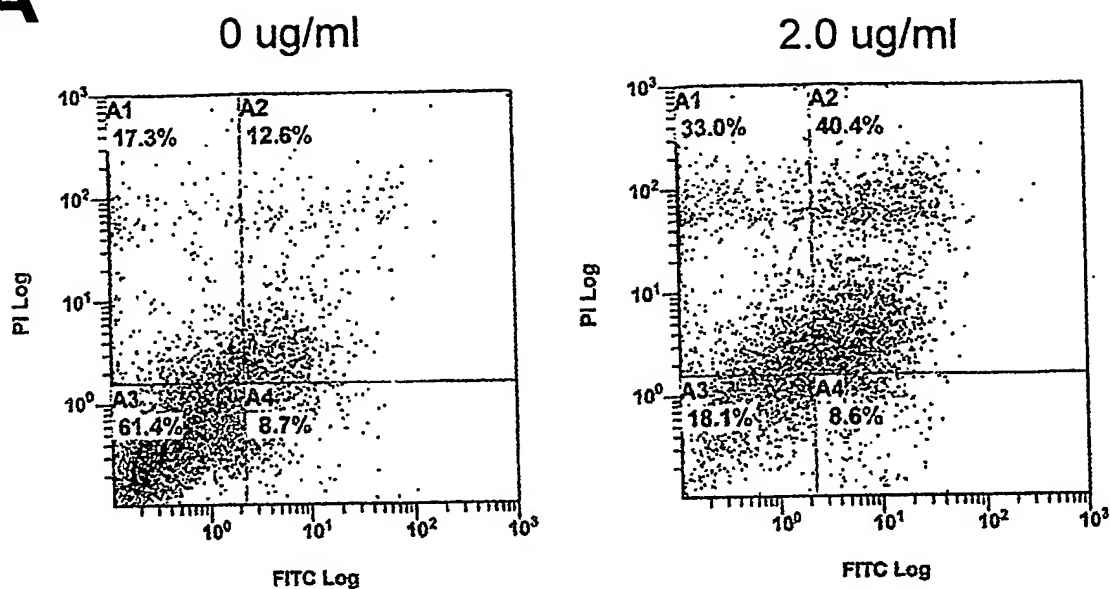
【図 15】



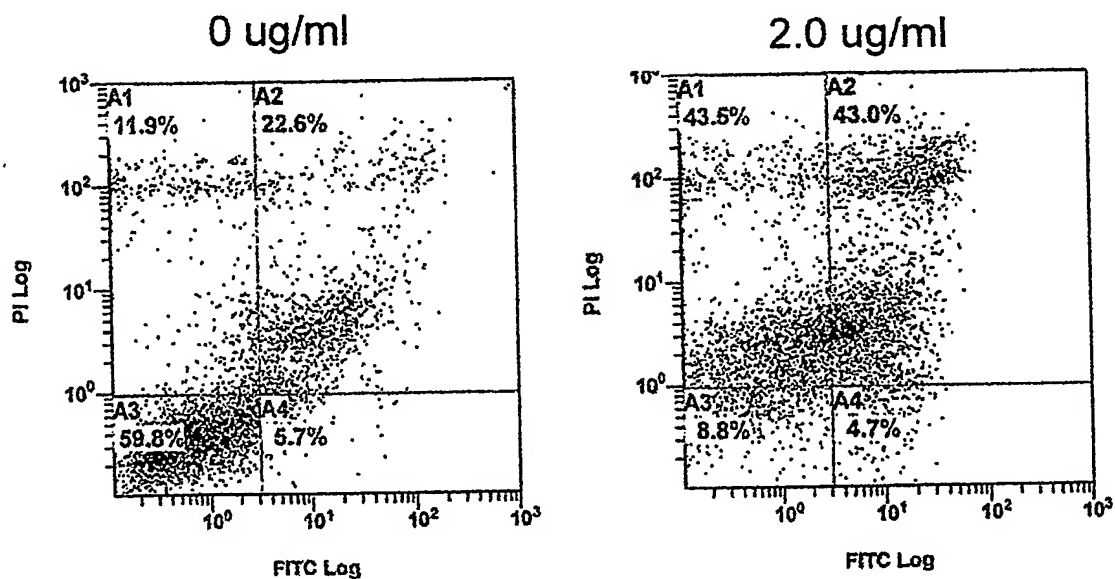


【図 16】

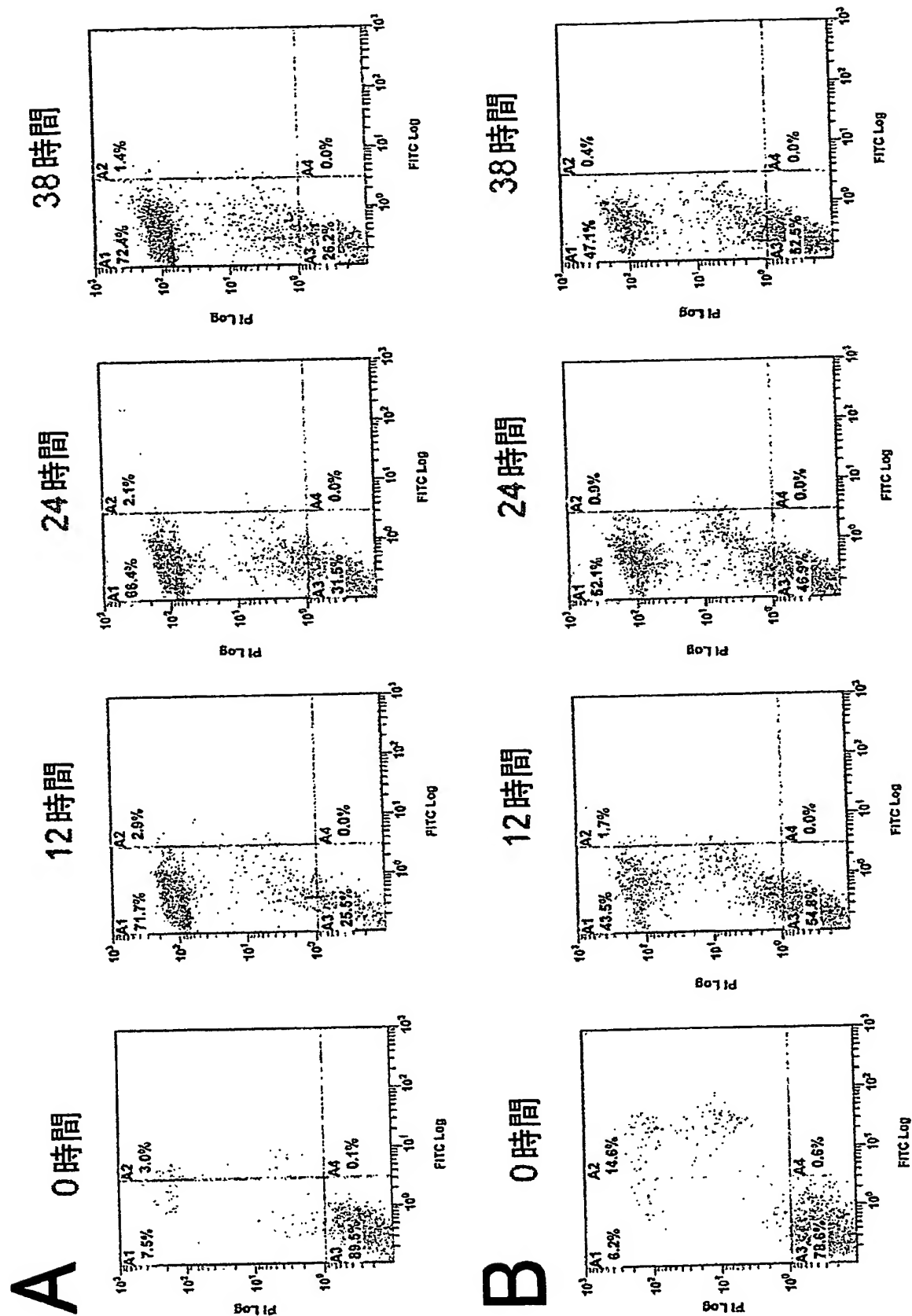
**A**



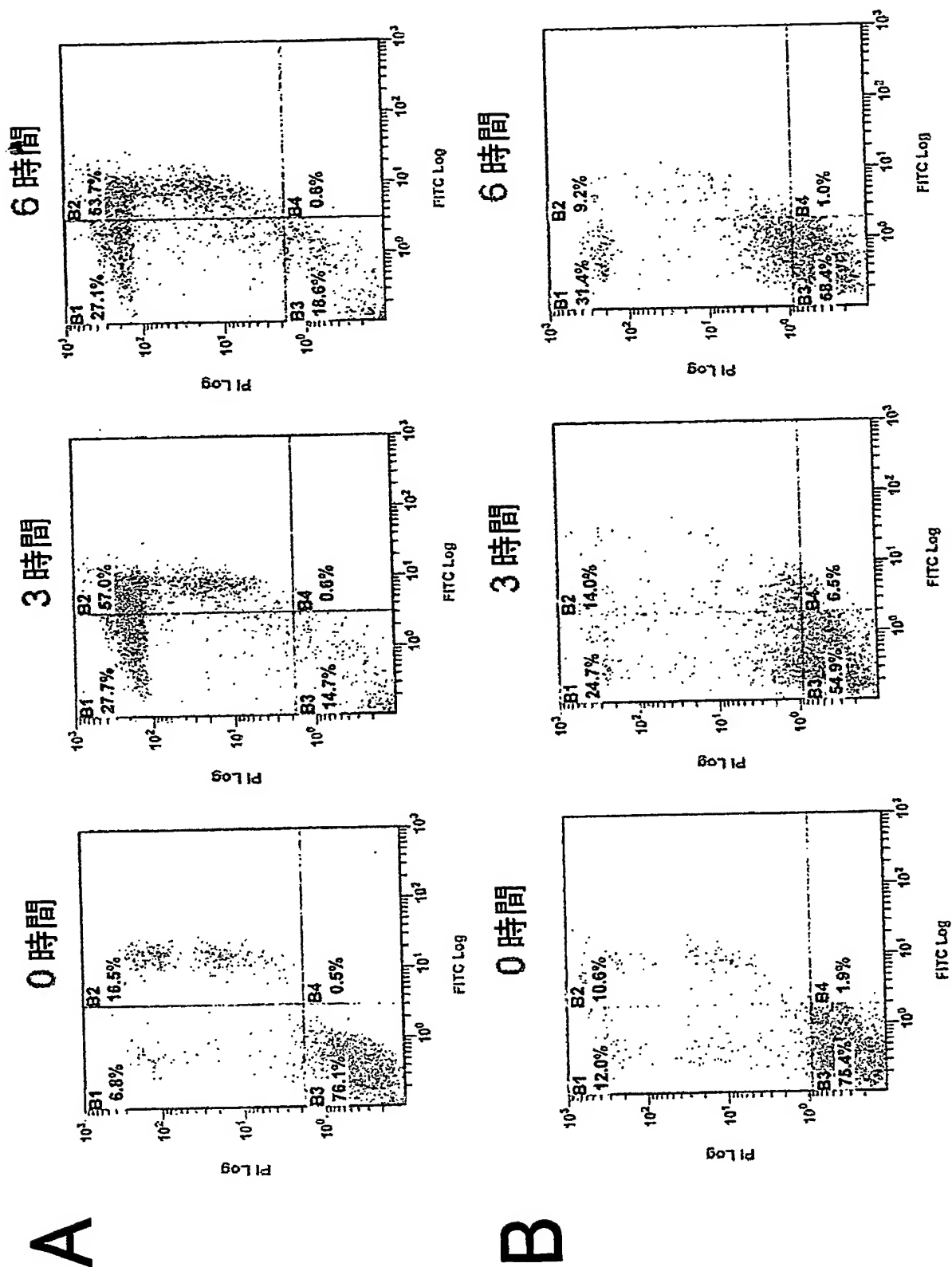
**B**



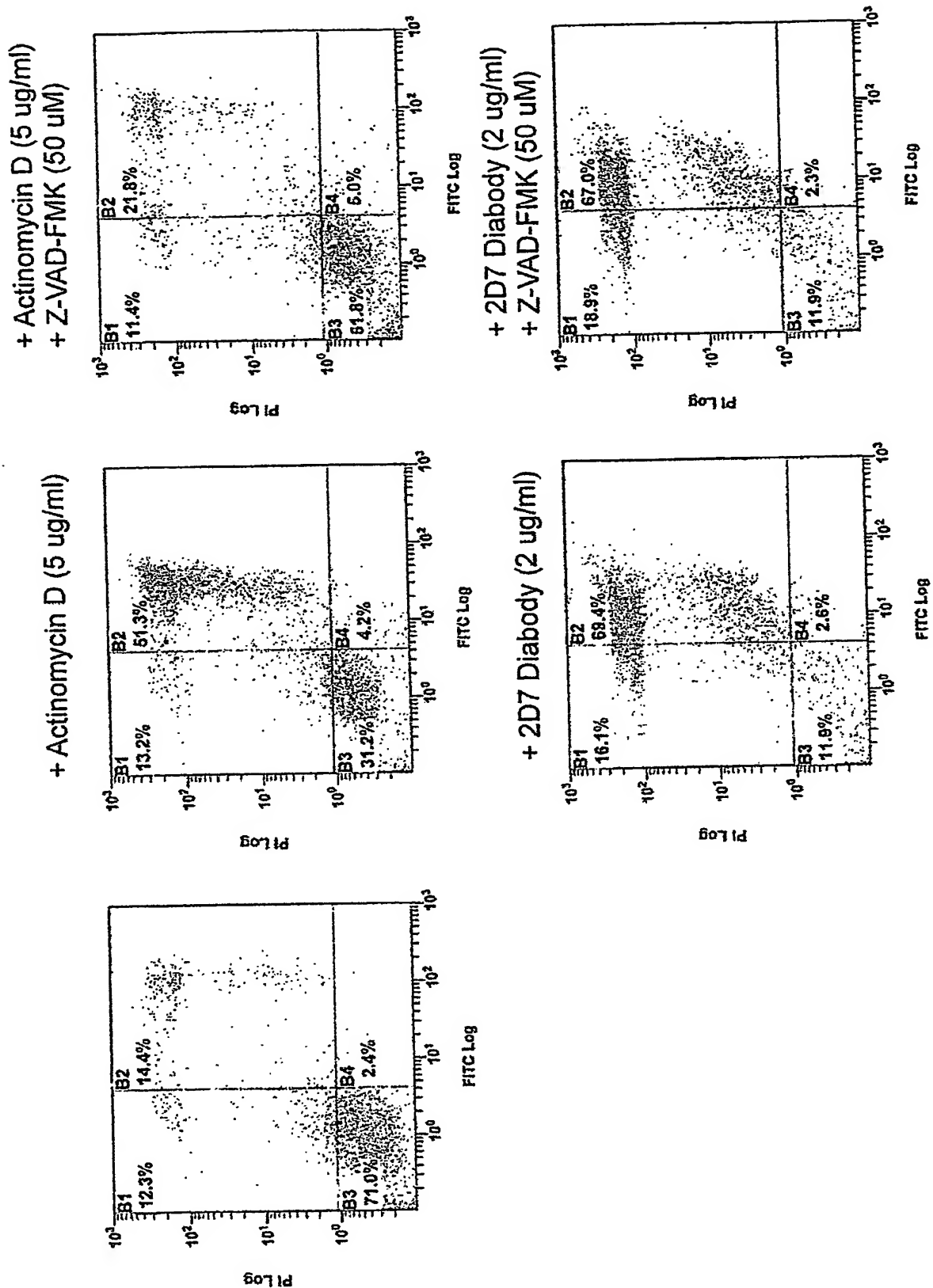
【図 17】



【図18】

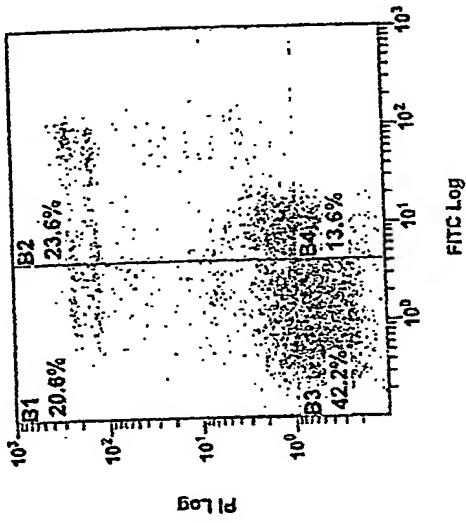


【図 19】

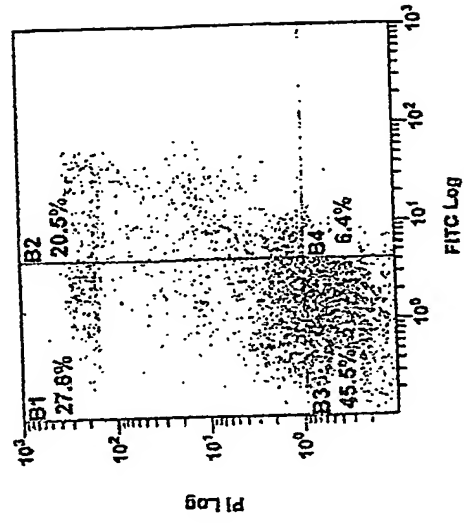


【図 20】

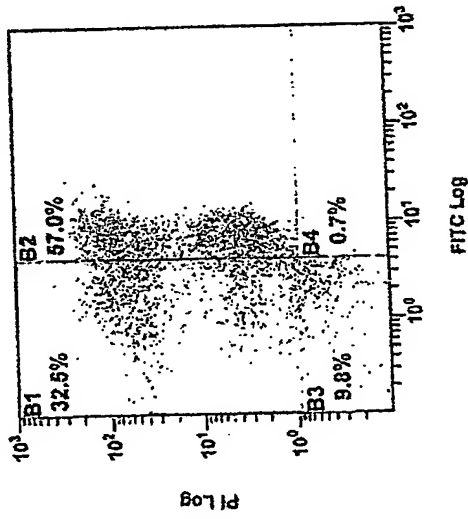
+ Actinomycin D (1 ug/ml)  
+ Z-VAD-FMK (50 uM)



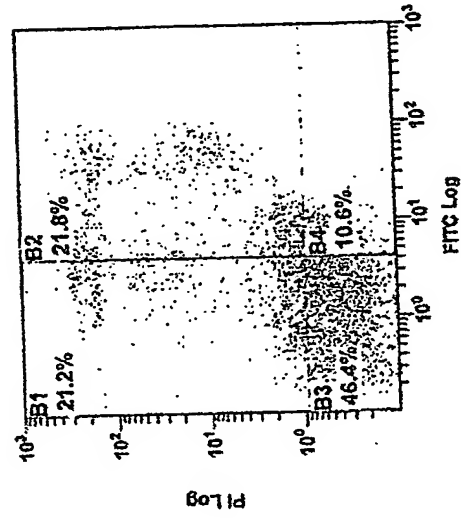
+ 2D7 Diabody (2 ug/ml)  
+ Z-VAD-FMK (50 uM)



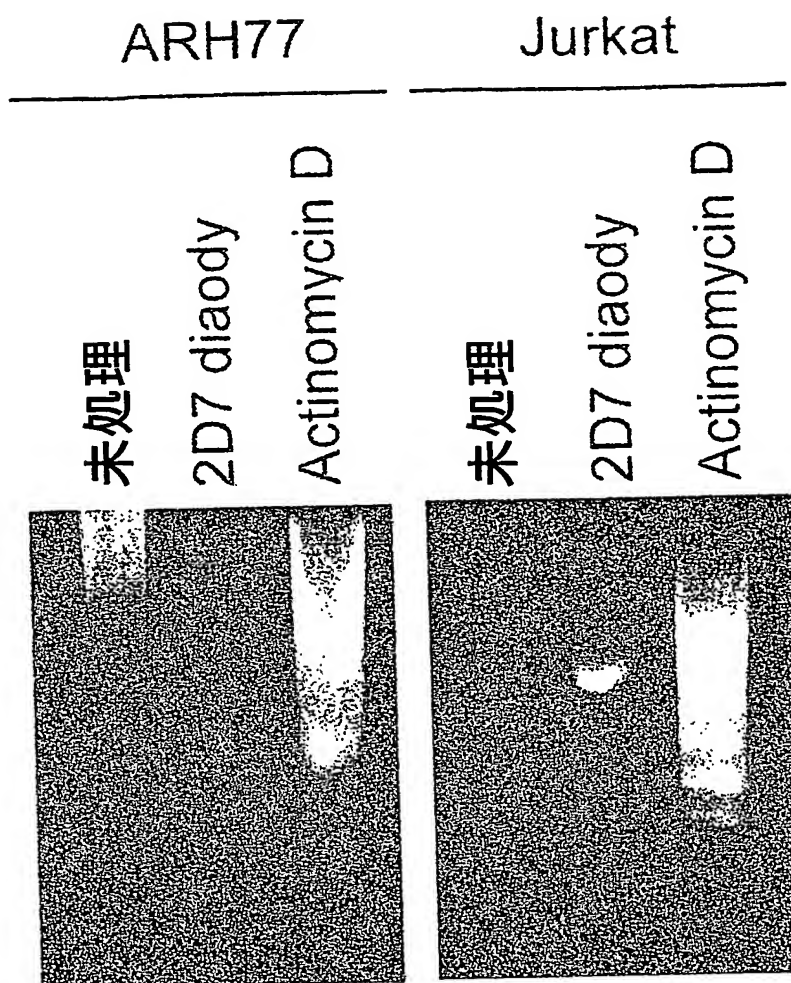
+ Actinomycin D (1 ug/ml)



+ 2D7 Diabody (2 ug/ml)



【図 21】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 HLAを認識する抗体の低分子化抗体を提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明者らは、2D7抗体の抗原を同定することを目的として、2D7抗原のクローニングを行った。その結果、2D7抗原はHLA class I分子であることが示唆された。本発明者らは、この知見に基づき、2D7抗体が細胞死誘導活性を有するか否かを検討した。その結果、2D7抗体をさらに別の抗体でクロスリンクすることで核の断片化が観察され、細胞死が誘導されることが分かった。さらに、2D7抗体のDiabodyは、さらに別の抗体を添加しなくても非常に強力な細胞死誘導活性を有することが判明した。以上の結果は、HLAを認識する抗体の低分子化抗体が細胞死誘導剤として利用できることを示している。

【選択図】 なし

特願 2002-299289

出願人履歴情報

識別番号

[000003311]

1. 変更年月日

1990年 9月 5日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都北区浮間5丁目5番1号

氏 名

中外製薬株式会社



特願 2 0 0 2 - 2 9 9 2 8 9

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[ 5 0 2 3 7 1 4 5 1 ]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 1 0 月 1 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

徳島県徳島市中吉野町 3 丁目 5 0 - 1

氏 名

尾崎 修治

特願2002-299289

出願人履歴情報

識別番号

[502371819]

1. 変更年月日

2002年10月11日

[変更理由]

新規登録

住 所

徳島県徳島市南佐古3番町7-12

氏 名

安倍 正博